



INSTYTUT FIZYKI  
UNIwersytet Jagielloński

Małgorzata Florek-Wojciechowska

# **Właściwości strukturalne i funkcjonalne kutikuli Coleoptera**

Praca na stopień doktora nauk fizycznych w dziedzinie biofizyka  
wykonana w Zakładzie Radiospektroskopii Instytutu Fizyki UJ

promotor: dr hab. Hubert Harańczyk  
(Instytut Fizyki UJ)

promotor pomocniczy: dr hab. Stanisław Knutelski  
(Instytut Zoologii UJ)

Kraków 2016



## Oświadczenie

Ja niżej podpisana *Małgorzata Florek-Wojciechowska* (nr indeksu: 432) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „*Właściwości strukturalne i funkcjonalne kutikuli Coleoptera*” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr. hab. *Huberta Harańczyka* i dr. hab. *Stanisława Knutelskiego*. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.





Kraków, 20 czerwca 2016 r.

## Oświadczenie

Oświadczam, że przedłożone egzemplarze pracy doktorskiej Małgorzaty Florek-Wojciechowskiej pt. „*Właściwości strukturalne i funkcjonalne kutikuli Coleoptera*” stanowią wersję ostateczną.

dr hab. Hubert Harańczyk

dr hab. Stanisław Knutelski



# Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować moim promotorom - dr. hab. Hubertowi Harańczykowi oraz dr. hab. Stanisławowi Knutelskiemu, za wszechstronną pomoc, zaangażowanie, cierpliwość, przekazaną wiedzę i czas poświęcony na prowadzenie dyskusji naukowych, jakie zaowocowały powstaniem niniejszej pracy. Panu dr. hab. Stanisławowi Knutelskiemu dziękuję szczególnie za dostarczenie materiału do badań.

Dziękuję także pracownikom i doktorantom Zakładu Radiospektroskopii, w szczególności prof. dr. hab. Kazimierzowi Łątce za wsparcie podczas pracy w Zakładzie, inż. Tomaszowi Malarzowi za pomoc w obsłudze spektrometru MRJ oraz dr. Piotrowi Nowakowi za długie dyskusje na naukowe, jak i nienaukowe tematy.

Składam również podziękowania dr. hab. Danucie Kruk za umożliwienie przeprowadzenia pomiarów relaksometrii magnetycznego rezonansu jądrowego zmiennego pola oraz pomoc w interpretacji wyników.

Dziękuję prof. dr. hab. Józefowi Mościckiemu za wsparcie, jakiego udzielał przez całe studia III stopnia jako Kierownik Studiów Doktoranckich z Biofizyki.

Przede wszystkim dziękuję jednak mojej rodzinie za okazaną pomoc i cierpliwość.



# Spis treści

<b>1</b>	<b><i>Wprowadzenie</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Kutikula chrząszczy</i></b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Kutikula - skład chemiczny i struktura</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Chityna .....	3
2.1.2	Białka kutikularne .....	6
2.1.3	Pozostałe składniki kutikuli.....	7
2.1.4	Struktura prokutikuli .....	7
<b>2.2</b>	<b>Straty wody przez kutikulę</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b><i>Rząd Coleoptera</i></b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Budowa ciała</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2</b>	<b>Pokrywy</b> .....	<b>10</b>
3.2.1	Struktura .....	10
3.2.2	Funkcja .....	11
<b>4</b>	<b><i>Właściwości wody w układach biologicznych</i></b> .....	<b>12</b>
<b>4.1</b>	<b>Struktura i właściwości fizykochemiczne wody</b> .....	<b>12</b>
<b>4.2</b>	<b>Dynamika molekularna wody</b> .....	<b>13</b>
<b>4.3</b>	<b>Sorpcja na powierzchniach</b> .....	<b>14</b>
4.3.1	Izotermy sorpcyjne i ich klasyfikacja.....	15
4.3.2	Izoterma Langmuira .....	16
4.3.3	Izoterma Brunauer-Emmet-Taller (BET).....	17
4.3.4	Izoterma GAB .....	21
4.3.5	Izoterma Denta .....	24
4.3.6	Izoterma GDW .....	24
<b>5</b>	<b><i>Magnetyczny Rezonans Jądrowy</i></b> .....	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Moment pędu i moment magnetyczny jądra</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Magnetyzacja jądrowa</b> .....	<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>Precesja Larmore'a i zjawisko MRJ</b> .....	<b>31</b>
<b>5.4</b>	<b>Procesy relaksacyjne</b> .....	<b>32</b>
5.4.1	Oddziaływanie dipolowe .....	33
5.4.2	Oddziaływanie kwadрупolowe .....	34

5.4.3	Ruch wektora magnetyzacji.....	36
5.4.4	Relaksacja podłużna.....	37
5.4.5	Relaksacja poprzeczna.....	37
5.4.6	Czasy korelacji.....	38
5.4.7	Transfer polaryzacji między jądrami $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .....	40
5.4.8	Transfer polaryzacji między jądrami $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ .....	42
<b>5.5</b>	<b>Obserwacja zjawiska MRJ.....</b>	<b>43</b>
5.5.1	Wzbudzenie układu spinów i detekcja sygnału.....	43
5.5.2	Kształt linii rezonansowych w domenie częstości.....	44
<b>6</b>	<b><i>Materiały i metody</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1</b>	<b>Preparatyka pokryw chrząszczy.....</b>	<b>48</b>
6.1.1	Przedmiot badań.....	48
6.1.2	Preparatyka.....	49
<b>6.2</b>	<b>Skaningowa mikroskopia elektronowa.....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Badanie kinetyki hydratacji.....</b>	<b>50</b>
<b>6.4</b>	<b>Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego.....</b>	<b>51</b>
6.4.1	Spektroskopia $^1\text{H}$ MRJ.....	51
6.4.2	Relaksometria FC-NMR.....	54
<b>7</b>	<b><i>Wyniki</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>7.1</b>	<b>Mikrogramy SEM.....</b>	<b>56</b>
<b>7.2</b>	<b>Analiza izotermy sorpcyjnej.....</b>	<b>62</b>
7.2.1	Konstrukcja izotermy sorpcyjnej.....	62
7.2.2	Porównanie modeli izoterm sorpcyjnych.....	63
<b>7.3</b>	<b>Analiza kształtu linii <math>^1\text{H}</math>-NMR.....</b>	<b>69</b>
<b>7.4</b>	<b>Zależności hydratacyjne widm <math>^1\text{H}</math>-NMR dla pokryw <i>Donus comatus</i>, <i>Liparus glabrirostris</i> oraz <i>Tenebrio molitor</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>7.5</b>	<b>Pomiary zależności temperaturowych widm <math>^1\text{H}</math>-NMR dla pokryw <i>Donus</i> <i>comatus</i>, <i>Liparus glabrirostris</i> oraz <i>Tenebrio molitor</i>.....</b>	<b>81</b>
<b>7.6</b>	<b>Pomiary spektroskopii relaksacyjnej <math>^1\text{H}</math>-NMR dla pokryw <i>Donus comatus</i>, <i>Liparus glabrirostris</i> oraz <i>Tenebrio molitor</i>.....</b>	<b>87</b>
7.6.1	Czas relaksacji podłużnej $T_1$ .....	87
7.6.2	Czas relaksacji poprzecznej $T_2$ .....	94
<b>7.7</b>	<b>Pomiar transferu magnetyzacji jądrowej.....</b>	<b>97</b>

7.7.1	Obserwacja transferu magnetyzacji jądrowej pomiędzy różnymi podukładami protonów w pokrywach chrząszczy.....	97
7.7.2	Obserwacja transferu $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ .....	100
<b>8</b>	<b><i>Dyskusja wyników</i></b> .....	<b>103</b>
<b>9</b>	<b><i>Wnioski</i></b> .....	<b>109</b>
<b>10</b>	<b><i>Literatura</i></b> .....	<b>111</b>
<b>11</b>	<b><i>Spis użytych skrótów</i></b> .....	<b>119</b>
<b>12</b>	<b><i>Spis symboli</i></b> .....	<b>121</b>
<b>13</b>	<b><i>Spis rysunków</i></b> .....	<b>123</b>
<b>14</b>	<b><i>Spis tabel</i></b> .....	<b>129</b>
<b>15</b>	<b><i>Spis publikacji autorki</i></b> .....	<b>131</b>





# 1 Wprowadzenie

Kutikula (oskórek) jest tkanką pochodzenia ektodermalnego tworzącą zewnętrzną warstwę ciała wszystkich stawonogów (Arthropoda) niezależnie od ich wieku i postembrionalnego stadium rozwojowego. W niektórych miejscach stanowi ona także zaczepienie dla mięśni, tworząc jednocześnie szkielet zewnętrzny. Pod względem chemicznym wykazuje dość złożoną budowę, zawiera lipidy, proteiny i chitynę. Przy tym jest nadzwyczaj trwała chemicznie, stanowiąc plastyczną substancję. Twardość oskórka jest związana ze stopniem jego wysycenia węglanem wapnia (np. skorupiaki) lub inkrustowania białkami (np. pajęczaki i owady). W toku ponad 400 letniej ewolucji kutikula wykształciła wiele różnych właściwości spełniających rozmaite funkcje stawonogów w zależności od środowiska i trybu ich życia (Gupta 2011). Struktura kutikuli owadów jest podobna do współczesnych kompozytów polimerowych wzmocnianych włóknami szklanymi czy węglowymi. Przy zbliżonej u różnych gatunków gęstości oskórka równej około  $1.2 \text{ kg/dm}^3$  cechuje się on bardzo szerokim zakresem zmienności (ponad 8 rzędów wielkości) modułu sztywności (Vincent i Wegst 2004). Tak szeroki zakres nie jest spotykany w innych strukturach pochodzenia naturalnego, a wśród materiałów wytworzonych przez człowieka jest niezmiernie rzadki. Wynika to, zarówno z modyfikacji poziomu usieciowienia białek strukturalnych i stopnia ich sklerotyzacji, jak również ze zmiany liczby i orientacji przestrzennej włókien chitynowych wplecionych w matrycę białkową. Poznanie i zrozumienie budowy oraz właściwości fizyczno-chemicznych kutikuli umożliwiłoby odtworzenie jej struktury i pozwoliłoby na skonstruowanie nowych generacji biomimetycznych materiałów. Nie do przecenienia jest także inny czynnik modyfikujący właściwości kutikuli, a mianowicie zawartość wody w tej tkance. Twardość i sztywność kutikuli owadów jest silnie skorelowana z poziomem jej uwodnienia (Klocke i Schmitz 2011), co umożliwiło, nie tylko owadom, wykształcenie szeregu strategii ochronnych przed wysuszeniem ich ciała (Ahearn 1970; Dirks & Taylor 2012; Le Lagadec i in. 1998).

Szczególnym rodzajem kutikuli są pokrywy (*elytrae*) chrząszczy - pierwsza para przekształconych skrzydeł. Choć nie biorą one udziału w lataniu, to pomagają utrzymać równowagę podczas lotu. Głównie jednak służą do ochrony drugiej pary błoniastych skrzydeł (jeśli są obecne) oraz ciała (śródułowie i zatułowie oraz odwłok) od strony grzbietowej. Pokrywy szczególnie zabezpieczają chrząszcze przed urazami mechanicznymi, promieniowaniem słonecznym i utratą wody. W zależności od środowiska i trybu życia danego gatunku lub grupy gatunków są one różnie wykształcone. Pomimo indywidualnych cech adaptacyjnych, pokrywy wszystkich Coleoptera łączy podobna

budowa chemiczna (m.in. włókna chitynowe, kolagen i amylaza) oraz lekkość połączona z niezwykle sztywnością (Guo i in. 2012).

Dotychczasowe badania pokryw chrząszczy skupiają się głównie na poznaniu morfologii ich powierzchni (Holloway 1997; Zhixian i in. 2010), mechanizmu ich łączenia (Fedorenko 2009) oraz właściwości mechanicznych (Yu i in. 2013; Zhixian i in. 2010), jednak - wedle wiedzy autorki - do tej pory nie zastosowano technik Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (MRJ) do obserwacji właściwości wody związanej do tego typu tkanki.

W pracy przedstawiono wyniki badań pokryw trzech gatunków chrząszczy: *Liparus glabrirostris*, *Donus comatus* (rodzina ryjkowcowate, Curculionidae) i *Tenebrio molitor* (rodzina czarnuchowate, Tenebrionidae) z zastosowaniem mikroskopii skaningowej i technik MRJ. Zanalizowano procesy sorpcji wody z fazy gazowej oraz zmiany jej dynamiki wskutek zmiany temperatury i poziomu uwodnienia.

Rozdział drugi i trzeci dotyczy przedmiotu badań - pokryw chrząszczy. Najpierw opisano ich zróżnicowanie oraz najważniejsze funkcje w obrębie rzędu Coleoptera. Następnie omówiono skład chemiczny i budowę, ze szczególnym wyszczególnieniem struktury krystalicznej chityny.

W rozdziale czwartym przedstawiono właściwości fizykochemiczne wody ważne dla procesu sorpcji, które zostały zaobserwowane podczas badań. Opisano pięć modeli sorpcji wody na powierzchni, uwzględniając różne postulowane efekty powierzchniowe.

Rozdział piąty omawia teorię zjawiska MRJ, podano wybrane procesy magnetycznej relaksacji jądrowej.

W rozdziale szóstym opisano szczegółowo materiały i metody: preparatykę materiału, opis pomiarów mikroskopii elektronowej i grawimetrii oraz użytą aparaturę i zastosowane sekwencje MRJ.

Rozdział siódmy zawiera wyniki. W podrozdziale 7.1 przedstawiono mikrogramy pokryw wraz z opisem zaobserwowanych mikroobektów, w podrozdziale 7.2 zanalizowano zmierzoną izotermę sorpcyjną dla pokryw. Następne pięć podrozdziałów poświęcone jest różnym aspektom rezultatów eksperymentów MRJ: analizie kształtu widma, wielkości sygnału pochodzącego od różnych frakcji układu, czasom relaksacji oraz zjawiskom transferu magnetyzacji.

W rozdziale ósmym przedstawiono dyskusję uzyskanych wyników, w ostatnim rozdziale podsumowano zwięźle rezultaty przeprowadzonych badań.

## 2 Kutikula chrząszczy

Oskórek, nazywany także kutikulą lub kutykulą, po łacinie *cuticula*, jest wytworem nabłonka (naskórka), czyli tkanki okrywającej, która rozwija się z ektodermy (zewnątrzny listek zarodkowy, tkanka embrionalna). Kutikula zawiera wydzieliny naskórka w postaci różnych związków chemicznych, głównie chityny oraz rozmaitych białek. Okrywa ona ciało wielu zwierząt bezkręgowych, zwłaszcza stawonogi, np. skorupiaki, owady, wije i pajęczaki, wyściela także u nich przedni i końcowy odcinek układu pokarmowego. Ze względu na to, że przyczepiają się do niej mięśnie, kutikula jest również nazywana szkieletem zewnętrznym (Razowski 1987). U niektórych stawonogów oskórek jest znacznie pogrubiony i czasem niesłusznie określany „chitynowym pancerzem”. Podczas wzrostu osobnika zewnętrzna warstwa kutikuli jest co jakiś czas odrzucana i tworzy się nowa, większa, a zjawisko to określane jest linieniem (Tower 1906). U większości owadów oskórek jest bardzo zróżnicowany, zarówno pod względem struktury, jak też proporcji składników chemicznych i tworzy efektywną barierę przed ewaporacją wody z organizmu (Wigglesworth 1945). Dzięki takiej budowie i możliwościom wykazuje on niezwykle właściwości i spełnia rozmaite funkcje w zależności od środowiska życia gatunku. Kutikula może też ulegać różnym modyfikacjom chemicznym i strukturalnym w zależności od części ciała danego organizmu i pełnionej funkcji.

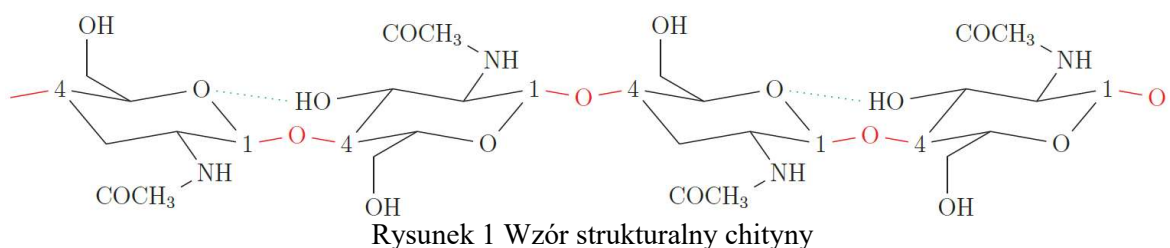
### 2.1 Kutikula - skład chemiczny i struktura

Kutikula jest tworem epidermy, można wydzielić w niej dwie główne warstwy, a mianowicie zawierającą chitynę prokutikulę (obszar wewnętrzny o grubości do 200  $\mu\text{m}$  dzielący się na oskórek wewnętrzny i zewnętrzny, czyli endokutikulę i egzokutikulę) oraz powierzchniową epikutikulę - bezchitynową warstwę o grubości 1-4  $\mu\text{m}$  (Chapman 1998; Grabda 1985).

#### 2.1.1 Chityna

Chityna jest jednym z najważniejszych biopolimerów występujących w przyrodzie. Pod względem chemicznym należy do wielocukrów (polisacharydów). Stanowi znaczną część ciała bezkręgowców (u owadów obejmuje 20–50% suchej masy kutikuli), grzybów

i niższych roślin. Po celulozie jest najczęściej występującym biopolimerem (Rinaudo 2006). Te dwa wielocukry są zresztą do siebie podobne, z tą tylko różnicą, że grupy hydroksylowe przyłączone do drugiego atomu węgla są w chitynie zastąpione grupą aminoacetylową. U owadów funkcjonuje jako materiał tworzący rusztowanie podtrzymujące kutikulę naskórka oraz tchawki, jak też półprzepuszczalną membranę wyścielającą nabłonek jelita (Merzendorfer & Zimoch 2003). Chityna u owadów występuje w prokutikuli, obejmując 60% masy oskórka właściwego (endokutikula i mezokutikula) oraz 22% oskórka pigmentowego (egzokutikuli). Natomiast w epikutikuli, jak już wcześniej wspomniano, zupełnie brak chityny.



Chityna, opisana wzorem sumarycznym  $(C_8H_{13}O_5N)_N$ , jest (1,4- $\beta$ -)-2-acetyloamino-2-dezoksy-D-glukopiranozą, jest zbudowana z łańcuchów reszt N-acetyloglukozaminowych, które łącząc się ze sobą wiązaniami wodorowymi tworzą mikrowłókna o średnicy 2.5–3 nm wbudowane w białkową matrycę. Mikrowłókna te wykazują się strukturą krystaliczną wynikającą z wiązań wodorowych między grupami karbonyłowymi i grupami hydroksylowymi występującymi przy węglu C-6 oraz grupami wodorotlenowymi przy węglu C-3 i tlenem z pierścienia piranozowego (Petrov i in. 2013).

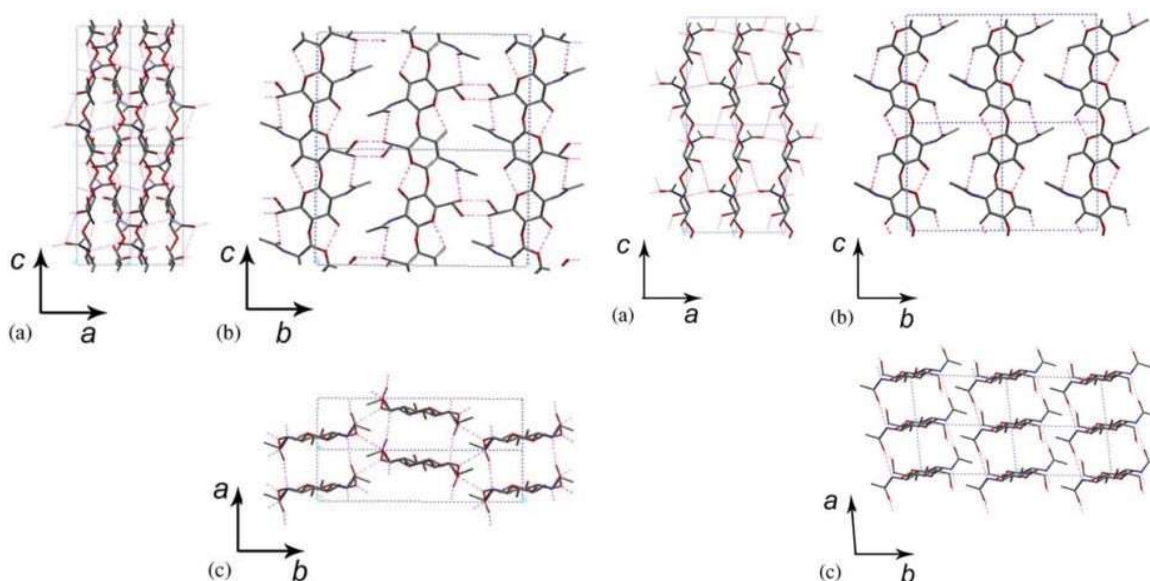
Chityna, tak jak i celuloza, wykazuje polimorfizm. W przybliżeniu liniowe łańcuchy chityny skręcają się wzdłuż osi polimeru; pełny skręt występuje co 10.1-10.5 Å (Tharanathan i Kittur 2003). Jednostki glikozydowe są chiralne, więc o każdym łańcuchu polimeru można powiedzieć, że jest prawo- lub lewoskrętny. Wykazano istnienie trzech form krystalicznych chityny:

1.  $\alpha$ -chityna to najpowszechniejsza forma występująca w przyrodzie. Sąsiadujące łańcuchy są względem siebie antyrównoległe, tworzą płaszczyzny stabilizowane wiązaniami wodorowymi, głównie silnymi wiązaniami C–O...NH. Łańcuchy chitynowe są od siebie odległe o ok. 0.47 nm. Występują też wiązania wodorowe między kolejnymi płaszczyznami (wzdłuż kierunku  $b$  – patrz Rys. 2), zwłaszcza

między grupami hydroksymetylowymi. Komórka elementarna sieci  $\alpha$ -chityny jest ortorombiczna.

2.  $\beta$ -chityna, rzadziej spotykana, występuje m.in. w szkielecie kałamarnic. Łańcuchy chitynowe są ułożone równolegle, komórka elementarna jest jednoskośna. Struktura  $\beta$ -chityny jest pozbawiona wiązań wodorowych w kierunku osi  $b$  (patrz Rys. 2), przez co jest podatna na pęcznienie oraz hydrolizę pod wpływem nisko stężonych kwasów w znacznie większym stopniu niż  $\alpha$ -chityna.

3.  $\gamma$ -chityna - najrzadsza forma, zaobserwowana jedynie w nabłonku żołądków głowonogów. Stanowi ona swego rodzaju połączenie form  $\alpha$  i  $\beta$ . Kolejne jej łańcuchy są ułożone względem siebie następująco: antyrównoległe, antyrównoległe i równoległe (co schematycznie można przedstawić jako układ  $\uparrow\downarrow\downarrow$ ). Jej struktura, podobnie jak w przypadku chityny typu  $\beta$ , może być łatwo penetrowana przez cząsteczki wody.



Rysunek 2 Porównanie struktury  $\alpha$ -chityny (po lewej) i  $\beta$ -chityny (po prawej): (a) projekcja ac; (b) projekcja bc; (c) projekcja ab. Struktura zawiera dwie konformacje grup  $-\text{CH}_2\text{OH}$  (Rinaudo 2006)

Analiza właściwości elastycznych tych trzech form krystalicznych chityny wykazała, że różnią się one między sobą sztywnością, twardością i rozciągliwością o kilka rzędów wielkości oraz że parametry mechaniczne chityny zależą od poziomu uwodnienia:  $\alpha$ -chityna jest wśród nich najsztywniejsza (Jollès i Muzzarelli 1999). Chityna nie jest rozpuszczalna

w większości substancji, rozpuszczają ją dopiero silne kwasy i zasady w temperaturze przekraczającej 150°C.

### 2.1.2 Białka kutikularne

Białka stanowią czasem ponad połowę suchej masy kutikuli owadów i znajdują się głównie w prokutikuli (Klowden 2013). Metodą rentgenografii wykazano, że oskórki skorupiaków i owadów są zbudowane przemiennie z łańcuchów chitynowych i białkowych. W takim kompleksie na trzy łańcuchy chityny przypada jeden łańcuch białka z regularnymi odstępami między łańcuchami białka, a nieregularnymi między łańcuchami chitynowymi. Wielkość odstępów jest zależna od poziomu uwodnienia chityny, a także od jej pęcznienia (Witas 1995). Część białek jest związana bezpośrednio z łańcuchami chityny, reszta zaś gromadzi się między płaszczyznami chityny tworząc zwartą sieć. Połączenia chityny z białkami mają najprawdopodobniej charakter kowalencyjny. Proteom kutikuli danego gatunku może zawierać ponad 100 białek, a ich rodzaj zależy też od części kutikuli, jaką tworzą. Zwykle białka miękkich fragmentów oskórka zawierają więcej kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, histydyny, lizyny i tyrozyny niż te białka, które tworzą jego sztywniejsze fragmenty .

Prokutikula jest zbudowana głównie ze sklerotyiny - nadaje sztywność kutikuli, artropodyny - złożonej głównie z glikoprotein i rozpuszczalnej w wodzie oraz rezyliny - białka zapewniającego sprężystość i właściwości elastyczne. Sucha rezylina jest twarda i sztywna, po uwodnieniu staje się elastyczna i wszystkie jej odkształcenia stają się odwracalne. Rezylina magazynuje energię sprężystości w stawach odnóży, ścianach tułowia oraz przyczepach skrzydeł owadów (Chapman 1998).

Przeprowadzone na mączniku młynarku (*Tenebrio molitor* L.) badania wykazały brak różnic w składzie białek kutikuli larwy i poczwarki, natomiast takie różnice zaobserwowano pomiędzy białkami kutikuli poczwarki i postaci doskonałej. Ponadto, u osobników dojrzałych skład białkowy kutikuli części brzusznej odwłoka różni się od białek kutikuli jego części grzbietowej. Warto też podkreślić, że białka kutikularne dorosłego owada zawierają dwa razy więcej glicyny niż alaniny, zaś u larw i poczwarek - dwa razy mniej (Andersen i in. 1995).

Białka w kutikuli mają charakter hydrofobowy i przed linieniem agregują oraz wypychają wodę z obszarów międzybiałkowych w kierunku hydrofilowych

fragmentów sieci. Powstają wtedy małe obszary z wodą pułapkowaną w obrębie zasadniczo hydrofobowej struktury. Natomiast twardnienie (sklerotyzacja) kutikuli polega głównie na tworzeniu mostków (poprzez reszty fenolowe, chinony) pomiędzy białkami, dzięki czemu powstaje sztywna matryca (Mun i in. 2015). Podczas sklerotyzacji część wody kutikularnej jest usuwana i zastępowana m.in. związkami aromatycznymi, które dodatkowo sieciują strukturę. Przeprowadzone na szarańczy wędrowniej (*Locusta migratoria* L.) badania wykazały, że przez pierwsze sześć godzin procesu sklerotyzacji zawartość wody kutikularnej maleje z 43 do 32% suchej masy kutikuli (Andersen i in. 1995).

### **2.1.3 Pozostałe składniki kutikuli**

Powierzchnię epikutikuli oskórka pokrywają woski będące mieszaniną węglowodorów o 25-31 atomach węgla, alkoholi o 24-34 atomach węgla, oraz steroli i estrów kwasów tłuszczowych (Lapointe i in. 2004; Klowden 2013). Epikutikula decyduje o nieprzepuszczalności pokrywy dla wody. Jeśli owad jest narażony na temperatury przekraczające temperaturę topnienia wosków kutikularnych, następuje gwałtowny wzrost utraty wody przez kutikulę. Temperatura topnienia zależy od składu wosków i jest różna dla różnych gatunków.

Chityna cechuje się także dużą zdolnością do wiązania metali wyłapywanych ze środowiska, co znalazło zastosowanie w procesie uzdatniania wody (Pinto i in. 2011; Franzle 2015). Zaobserwowano też wpływ substancji nieorganicznych na właściwości kutikuli, np. obecność cynku, manganu i żelaza zwiększa twardość oraz wzmacnia odporność na ścieranie się kutikuli, np. tworzącej żuwaczki u przedstawicieli wielu różnych rzędów owadów, jak: chrząszcze, prostoskrzydłe, straszyki, motyle, błonkówki i inne (Andersen i in. 1995; Chapman 1998). Metale te mogą osiągać aż 16% suchej masy brzegów tnących żuwaczek (Schofield i in. 2002)..

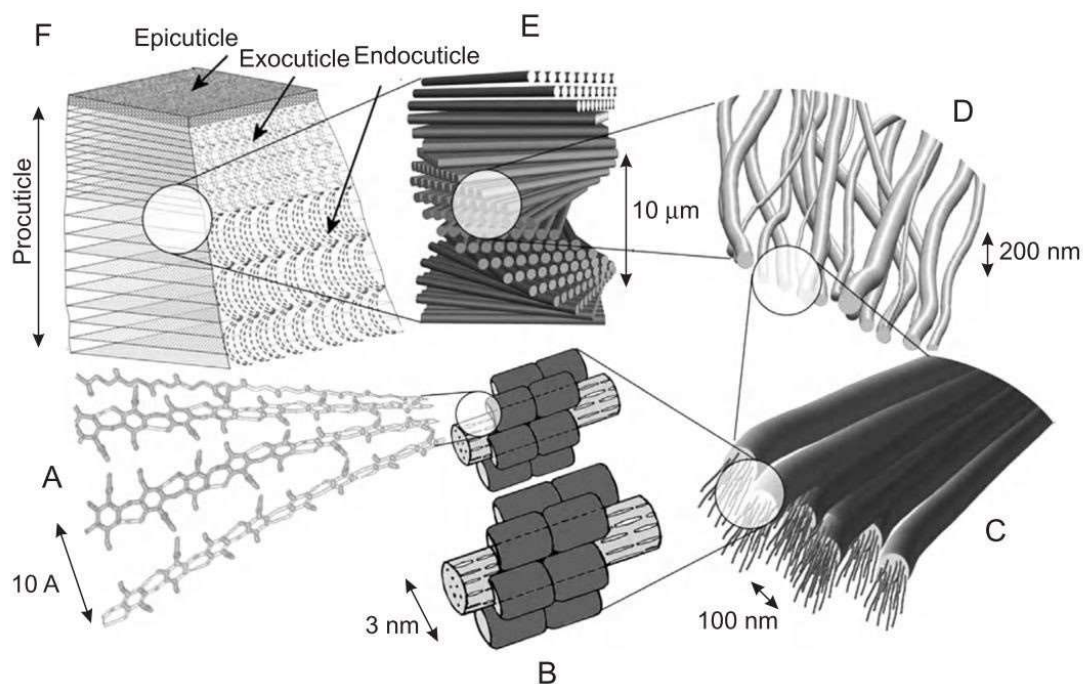
Epikutikula zawiera także barwniki, np. keratynę i melaninę, które obok swoistej struktury oskórka, nadają ciału owada konkretne ubarwienie.

### **2.1.4 Struktura prokutikuli**

Chityna w prokutikuli połączona jest w nanowłókna o średnicy ok. 3 nm i długości 300 nm, z których każde zawiera 18-25 łańcuchów (Atkins 1985; Klowden 2013). Szacuje się, że wartość modułu Younga pojedynczego nanowłókna wynosi ok. 150 GPa, jest więc

nieznacznie większa niż w przypadku celulozy i około 10 razy mniejsza niż dla najsztyniejszych syntetycznych nanorurek (Vincent i Wegst 2004). Te nanowłókna chityny są stabilizowane przez wiązania wodorowe pomiędzy grupami aminowymi i karbonylowymi. Pęki nanowłókien wraz z otaczającymi białkami tworzą warstwy, w obrębie których są one ułożone równolegle względem siebie. Kierunek wyznaczony przez nanowłókna skręca z każdą warstwą, przez co makroskopowo prokutikula ma formę określaną jako helikalnie skręcona „sklejka”.

Za sztywność struktury prokutikuli odpowiada głównie egzokutikula, która w największym stopniu ulega sklerotyzacji (Kamp i Greven 2010).



Rysunek 3 Schematyczna budowa prokutikuli A – antyrównoległe ułożone łańcuchy chitynowe. B - nanowłókna utworzone z pęczków 18–25 łańcuchów ustabilizowanych białkami. C - zgrupowane nanowłókna tworzące chitynowo-białkowe włókna o długości 50–300 nm. D - chitynowo-białkowe sieci włókien. E - struktura „skręconej sklejki” utworzona przez helikalnie ułożone warstwy chitynowo-białkowe. F - przekrój przez kutikulę (Klowden 2013)

## 2.2 Straty wody przez kutikulę

Przepuszczalność kutikuli dla wody jest różna u różnych gatunków chrząszczy. Zależy także od środowiska oraz trybu życia i w szczególności zmienia się wraz z wilgotnością i temperaturą środowiska. Utrata wody przez kutikulę ograniczana jest dzięki epikutikularnym lipidom, a zwłaszcza zewnętrznej warstwie wosku. Świadczy o tym m.in.



spotykany u wielu gatunków gwałtowny ubytek wody wraz ze wzrostem temperatury, co jest spowodowane, najprawdopodobniej, topieniem się wosków (Lockey 1960). Skokowy wzrost utraty wody z ciała następuje w temperaturze znacznie wyższej od temperatury naturalnego środowiska owada, a zmiana przepuszczalności jest trwała (Klowden 2013). Ważna jest nie tylko grubość samej epikutikuli, ale też skład woskowej warstwy, gdyż długołańcuchowe lipidy topią się w wyższych temperaturach (Patel i in. 2001). Wydaje się, że kanały, będące pozostałością po wypustkach naskórka, wraz z porami są najważniejszą drogą transportu wody przez kutikulę. Przepuszczalność kutikuli tym kanałem może być regulowana hormonalnie poprzez przymykanie i otwierania otworów (Machin i in. 1994).

## 3 Rząd Coleoptera

Chrząszcze (Coleoptera) są najbardziej różnorodnym rzędem owadów na świecie liczącym ok. 360 000 opisanych gatunków (Bouchard i in. 2011). Również w Polsce należą do najbogatszej i najbardziej różnorodnej grupy zwierząt - 6076 poznanych dotychczas gatunków (Coleoptera Poloniae, stan na 27.05.2016).

### 3.1 Budowa ciała

Coleoptera od innych rzędów owadów wyróżniają się posiadaniem aparatu gębowego gryzącego oraz pokryw (*elytrae*) – zmodyfikowanej pierwszej pary skrzydeł nieprzejrzystych, nieraz bardzo twardych. Stąd, w starszych polskich pracach owady te były nazywane także tęgopokrywymi. Pokrywy są symetryczne, łączą się wzdłuż prostego szwu i zwykle sięgają końca odwłoka, choć niektóre grupy, jak np. kusakowate (Staphylinidae) mają pokrywy skrócone. Pokrywy nie mają widocznego użyłkowania, są za to pokryte punktowymi wgłębieniami lub rowkami. Oskórek pokryw jest zwykle pokryty włoskami, szczecinkami lub różnorodnymi łuski, może posiadać wyrostki lub zmarszczenia. Pod pokrywami chrząszczy znajdują się zwykle zwinięte, przejrzyste skrzydła błoniaste drugiej pary służące do latania, choć u niektórych chrząszczy są one zredukowane częściowo lub całkowicie (Crowson 1981).

## 3.2 Pokrywy

Cechą charakterystyczną chrząszczy, Coleoptera (z gr. *coleos* – osłona, pokrywa; *pteros* – skrzydło), jest m.in. posiadanie pokryw - zesklerotyzowanej pierwszej pary skrzydeł. Pokrywy powstają z tarcz (dysków) imaginalnych w stadium poczwarki podczas metamorfozy. Po jej opuszczeniu przez wykształconego w pełni chrząszcza pokrywy twardnieją w procesie sklerotyzacji. Zakrywają one u większości Coleoptera śródtułów, zatulów i odwłok. Rzadko są one skrócone, np. u kusaków lub niektórych omarlic.

### 3.2.1 Struktura

Podstawową część szkieletu pokrywy tworzy sześć żyłek, czemu odpowiada sześć pni tchawkowych biegnących wzdłuż pokrywy. Żyłki ułożone są równolegle i u kilku gatunków są widoczne w postaci wypukłych żeberk. Między innymi przebieg żyłek odróżnia chrząszcze od wspomnianych innych rzędów owadów. U chrząszczy, oprócz żyłek głównych pojawia się także wiele regularnie rozmieszczonych żyłek poprzecznych, przez co użyłkowanie pokryw ma postać gęstej siateczki o oczkach wypełnionych sklerotyną (Crowson 1981). Na przekroju poprzecznym pokrywy można wyodrębnić kutikulę zewnętrzną (grzbietową) i wewnętrzną (brzuszną), pomiędzy którymi znajduje się przestrzeń hemolimfatyczną z egzokutikularnymi beleczkami (*trabeculae*).

U większości chrząszczy powierzchnia zewnętrzna obu pokryw jest pokryta dziesięcioma rzędami wgłębień (rowków). Natomiast powierzchnia wewnętrzna pokrywy jest albo całkowicie gładka, bądź pokryta mikrowłóskami służącymi głównie do unieruchomienia złożonych pokryw (Gorb 1997; Gorb 1998). Warto zauważyć, że u chrząszczy wykształciło się wiele różnych mechanizmów domykających i blokujących pokrywy (Fedorenko 2009), a u niektórych (pewne gatunki czarnuchowatych) pokrywy są całkowicie zrośnięte ze sobą, tworząc szczelnie zamkniętą przestrzeń, wypełnioną powietrzem nawet w środowisku wodnym.

Zewnętrzna krawędź pokryw jest w mniejszym lub większym stopniu podwinięta do wewnątrz i tworzy tzw. epipleurę. U chrząszczy latających, po bokach podstawy pokryw znajdują się zazwyczaj tzw. guzy barkowe, które wskazują, że dany osobnik ma dobrze rozwiniętą drugą parę skrzydeł błoniastych i potrafi latać. Zmniejszenie ogólnej grubości pokryw lub/i zwiększenie przestrzeni hemolimfatycznej wpływa na zmniejszenie masy

pokrywy, a tym samym ułatwia lot owada. Chrząszcze nie latające mają zazwyczaj małą przestrzeń hemolimfatyczną.

Grubość pokryw waha się od kilkunastu do ponad 250  $\mu\text{m}$  i w dużej mierze skorelowana jest z rozmiarami dorosłego owada. Gatunki latające mają z reguły cieńsze pokrywy, składające się z mniejszej liczby warstw (Kamp i Greven 2010). Za niezwykle silną sklerotyzację pokryw odpowiada dominujący udział egzokutikuli - 65-86% grubości całej kutikuli pokrywy (Krzelj 1969).

### 3.2.2 Funkcja

Silna mechanicznie struktura pokryw sugeruje, że ich głównym zadaniem jest ochrona drugiej, delikatnej i błoniastej pary skrzydeł służącej do latania. Sztywne, dobrze przylegające do ciała pokrywy chronią ciało owada także przed uszkodzeniami mechanicznymi, wytarciem skrzydeł oraz utratą wody z organizmu. U większości chrząszczy pokrywy są podczas lotu rozłożone i choć nie wytwarzają dodatkowej siły ciągu, to generują siłę nośną, pomagając owadowi utrzymać się w powietrzu. Są jednak wyjątki, np. u niektórych gatunków chrząszczy chrabąszczowatych pokrywy się nie rozkładają w locie, a skrzydła wydostają się poprzez dolne otwory pomiędzy dolną krawędzią pokrywy a górną ścianą ciała. Podczas lotu pokrywy pozostają nieruchome bądź poruszają się z niską częstotliwością ok. 30-40 kHz (Sitorus i in. 2010). Doświadczenia przeprowadzone w tunelu aerodynamicznym pokazały, że obecność pokryw u *Heliocopris hamadryas* zwiększa wytwarzanie pionowej siły o 40%, choć odbywa się to kosztem zmniejszenia ogólnej wydajności aerodynamicznej (Johansson i in. 2012). W przypadku chrząszczy nie latających (np. Carabidae, niektóre Tenebrionidae) pokrywy są zrośnięte wzdłuż szwu i w ogóle nie odsłaniają części grzbietowej owada.

Ponadto pokrywy przykrywają także przetchlinki - otwory zewnętrzne tchawkowego układu oddechowego po bocznych stronach ciała. Utworzenie szczelnej komory między odwłokiem a pokrywami umożliwiło niektórym chrząszczom życie także w środowisku wodnym. Jest to również dodatkowa ochrona chrząszcza przed utratą wody podczas wymiany gazowej, jak też przed wnikaniem przez te otwory mikroorganizmów chorobotwórczych i pasożytniczych.

# 4 Właściwości wody w układach biologicznych

## 4.1 Struktura i właściwości fizykochemiczne wody

Już w 1780 r. Cavendish i Lavoisier wykazali, że woda jest związkiem złożonym z wodoru i tlenu w stosunku objętościowym 2:1. Dokładny skład wody (uwzględniający istnienie różnych izotopów:  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$  oraz  $^{14}\text{O}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{19}\text{O}$ ) zależy od jej pochodzenia, ale można przyjąć, że abundancje  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ,  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  i HDO wynoszą odpowiednio 0.2%, 0.04% i 0.03% (Eisenberg i Kauzmann 1969). W układach biologicznych dominuje forma  $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$  i to ona będzie w dalszej części rozumiana jako „woda”.

Kąt między wiązaniami O–H wody wynosi  $104.474^\circ$ , a długość wiązania -  $0.9575 \text{ \AA}$  (Eisenberg i Kauzmann 1969), wiązanie O–H to pojedyncze wiązanie kowalencyjne, spolaryzowane. Choć cząsteczka wody jest neutralna elektrycznie, to w jej obrębie ładunek elektryczny częściowo się rozdziela, atom tlenu ma większą gęstość elektronową niż atomy wodoru, a co za tym idzie pojawia się elektryczny moment dipolowy równy  $1.855 \text{ D}$  dla izolowanej cząsteczki. Ta silna polarność wody przyczynia się do tworzenia wiązań wodorowych między innymi cząsteczkami wody, a także innymi cząsteczkami polarnymi. W stanie ciekłym moment dipolowy wody jest większy o  $0.6\text{-}1.2 \text{ D}$ , zaś dla najpowszechniej występującego lodu heksagonalnego wartość ta wynosi  $3.09 \text{ D}$  (Batista i in. 1998).

Ponadto cząsteczka wody ma niezerowe składowe momentu kwadrupolowego  $Q_{xx}$ ,  $Q_{yy}$ ,  $Q_{zz}$ , jednak bardzo szybkie drgania molekularne zmniejszają odczuwany przez nią gradient pola elektrycznego, przez co pomiary tych wielkości w roztworze są praktycznie niemożliwe. Można za to wyznaczyć wartość średnią momentu kwadrupolowego, korzystając z równania

$$\bar{Q} = \frac{1}{3}(Q_{xx} + Q_{yy} + Q_{zz}) = \frac{1}{3} \left( -e \langle r^2 \rangle + e \sum_n Z_n r_n^2 \right) \quad (1)$$

gdzie  $Z_n$  jest liczbą atomową  $n$ -tego jądra,  $r_n^2$  jest kwadratem odległości tego jądra od środka masy,  $\langle r^2 \rangle$  jest wartością średnią odległości elektronów od środka masy cząsteczki, natomiast  $e$  jest ładunkiem elementarnym. Tak wyznaczony średni moment kwadrupolowy wody wynosi  $\bar{Q} = -5.6 \text{ D}\text{\AA}$  (Eisenberg i Kauzmann 1969). Obliczone na gruncie mechaniki

kwantowej wartości poszczególnych składowych (-4.27, -7.99, -5.94 DÅ (Tu i Laaksonen 2000)) wskazują na to, że rozkład ładunku cząsteczki wody jest zbliżony do sferycznego.

Jak większość lekkich cząsteczek woda nie posiada niesparowanych elektronów, a co za tym idzie jest diamagnetyczna. Podatność magnetyczna  $\chi$  jest tensorem, którego składowe wzdłuż każdej osi można zapisać jako sumę ujemnych przyczynków diamagnetycznych i mniejszych, dodatnich przyczynków paramagnetycznych ( $\chi_{xx} = \chi_{xx}^d + \chi_{xx}^p$ ). Choć wartości poszczególnych składowych diamagnetycznych nie są znane, to podobnie jak w przypadku momentu kwadrupolowego można wyznaczyć wartość średnią podatności magnetycznej:

$$\bar{\chi} = \frac{1}{3}(\chi_{xx} + \chi_{yy} + \chi_{zz}). \quad (2)$$

Wartość ta w bardzo nieznacznym stopniu zależy od fazy, zaś dla ciekłej wody równa się  $-1.63 \cdot 10^{-10} \text{ m}^3/\text{mol}$  (Eisenberg i Kauzmann 1969).

W lodzie Ih cząsteczki wody tworzą regularną tetraedryczną sieć przestrzenną składającą się z atomów tlenu, jednak otoczenie tlenu atomami wodoru nie ma takiej symetrii, ponieważ wiązania O-H mają różne długości. Taka struktura zawiera dużo wolnych przestrzeni, dzięki czemu w temperaturze topnienia gęstość lodu jest mniejsza niż gęstość wody w stanie ciekłym. Podczas topnienia lodu około 15% wiązań wodorowych zostaje zerwanych, jednak w temperaturze bliskiej temperatury topnienia istnieją klastry składające się nawet ze 100 cząsteczek wody, które zachowują jeszcze strukturę lodu.

Powstawanie wiązań wodorowych tłumaczy dużą adhezję wody, czyli zdolność do zwilżania powierzchni różnych substancji. Z drugiej strony, hydrofobowość niektórych związków lub fragmentów ich cząsteczek można tłumaczyć brakiem lub niewielką zawartością atomów donorowych, mogących tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody (np. w przypadku wosków, tłuszczów) (Barbosa-Cánovas i in. 2008; Eisenberg i Kauzmann 1969).

## 4.2 Dynamika molekularna wody

Cząsteczki wody mogą wykonywać trzy rodzaje ruchów: oscylacyjny, rotacyjny i translacyjny. Drgania oscylacyjne są ruchami wewnątrzcząsteczkowymi, zmieniającymi kształt molekuly poprzez rozciąganie, zmianę długości wiązań lub kątów między nimi. Ruch rotacyjny obejmuje obroty cząsteczki i zmianę jej orientacji względem otoczenia,

a ruch translacyjny opisuje zmianę położenia wskutek dyfuzji bądź ukierunkowanego przepływu. Zbudowana z trzech atomów molekula woda ma w sumie dziewięć stopni swobody.

Rodzaj i skala czasowa ruchów cząsteczek wody zależy od jej fazy, a ta z kolei jest funkcją temperatury i ciśnienia zewnętrznego, a w przypadku wody związanej z układem zależy także od jego struktury. W przypadku czystej wody warto dokładniej rozważyć trzy regiony wykresu fazowego. W warunkach normalnych ( $t = 20^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 1 \text{ atm}$ ) woda jest w stanie ciekłym i wykonuje wszystkie rodzaje ruchów, podobnie jak w fazie gazowej. W przypadku lodu Ih (najpowszechniejszego w przyrodzie) cząsteczki wody wykonują głównie drgania oscylacyjne, a ich swoboda rotacji i przemieszczania się jest mocno ograniczona.

Przejścia między wymienionymi fazami wymagają zmian entalpii, entropii, a także struktury. Przykładowo przejście fazowe z fazy stałej do fazy ciekłej zachodzi dzięki pobraniu energii na sposób ciepła (w warunkach stałego ciśnienia zewnętrznego, pobraniu entalpii), co z kolei skutkuje zmianą struktury, a tym samym spadkiem uporządkowania układu. Ten wzrost entropii podczas topnienia jest odzwierciedlony w mobilności cząsteczek, czyli uwolnieniu stopni swobody ruchów translacyjnego i rotacyjnego.

Dynamika wody związanej z innym układem, np. ciałem stałym jest istotnie różna. Wiązania chemiczne redukują możliwość ruchu cząsteczki, stąd cząsteczki wody, związane do powierzchni są mniej mobilne od cząsteczek wody w stanie ciekłym czy na granicy faz ciec-z-gaz.

### 4.3 Sorpcja na powierzchniach

Termin *sorpcja* jest zazwyczaj używany do opisu wstępnej fazy penetracji fazy skondensowanej przez cząsteczki danej substancji. Uwzględnia on adsorpcję, czyli gromadzenie się cząsteczek na powierzchni, absorpcję w objętości materiału oraz formowanie klastrów. Substancję, która ulega adsorpcji nazywana jest adsorbentem, a substancja na której ten proces zachodzi - adsorbentem lub podłożem. Na powierzchnię czynną adsorbentu (stałego) składają się również różnego rodzaju pory i kanaliki. Zależnie od stopnia rozdrobnienia adsorbentu zwiększa się jego powierzchnia właściwa, wyrażana jako powierzchnia na jednostkę masy.

Związek między względnym ciśnieniem par  $h$  i zawartością substancji w materiale opisuje w danej temperaturze izoterma sorpcyjna. W przypadku sorpcji wody względne ciśnienie par  $h$ , określane też potocznie wilgotnością względną, jest stosunkiem ciśnienia pary wodnej zawartej w powietrzu do ciśnienia pary nasyconej  $p_0$

$$h = \frac{p}{p_0}. \quad (3)$$

Zawartość wody w sorbencie można zaś zdefiniować jako masę zaabsorbowanej wody na jednostkę suchej masy.

W zależności od występujących oddziaływań między adsorbentem a adsorbentem wydziela się dwa rodzaje sorpcji. Adsorpcja fizyczna spowodowana jest siłami oddziaływań międzycząsteczkowych (siły van der Waalsa, wiązania wodorowe itp.), podczas gdy adsorpcja chemiczna związana jest z przejściem elektronów pomiędzy ciałem stałym, a substancją się adsorbującą. Proces ten wiąże się z powstaniem związku chemicznego między adsorbentem i pierwszą warstwą zaadsorbowanej substancji. Energia uwalniana w trakcie adsorpcji fizycznej jest tego samego rzędu co entalpia kondensacji, jej wartości wynoszą od kilku do około 50 kJ/mol, w przypadku chemisorpcji entalpia sorpcji jest o rząd wielkości i wynosi ok. 200 kJ/mol (Ościk 1979).

### 4.3.1 Izotermy sorpcyjne i ich klasyfikacja

Izoterma sorpcyjna określa to, jaka ilość substancji zostanie zaabsorbowana dla danego stanu układu (czyli dla zestawu parametrów: ciśnienia i temperatury w przypadku adsorpcji z fazy gazowej; ciśnienia, temperatury i stężenia w przypadku adsorpcji z roztworu). Ilość zaadsorbowanej substancji może zostać wyrażona jako pokrycie powierzchni, tzn. stosunek: miejsca adsorpcyjne zajęte/dostępne miejsca adsorpcyjne.

IUPAC (Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej) uznaje ogólną klasyfikację wyróżniającą sześć typów izoterm adsorpcji (Sing 1985):

- Typ I - charakterystyczny dla adsorbentów mikroporowatych, cechuje się monotonicznym zbliżaniem do adsorpcji granicznej, opisywany najprostszą izotermą Langmuira (Langmuir 1918);
- Typ II - najczęściej spotykany w przypadku adsorpcji fizycznej i wiąże się z powstaniem adsorpcyjnej warstwy wielomolekularnej, izoterma ma formę sigmoidy (Thommes 2010);

- Typ III (bardzo rzadko występujący) - charakterystyczny dla adsorbentów mikroporowatych; odpowiada przypadkom, gdy oddziaływanie adsorbentu z adsorbentem jest znacznie mniejsze niż oddziaływanie międzycząsteczkowe cząsteczek adsorbentu, izoterma ma formę sigmoidy;
- Typ IV - (rozpowszechniony) i V (rzadko występujący) – charakterystyczny dla mezoporowatych adsorbentów;
- Typ VI - adsorpcja wielowarstwowa na powierzchni jednorodnej, często stosowana do opisu sorpcji prostych gazów na powierzchniach węglowych (Steele i in. 1996).

### 4.3.2 Izoterma Langmuira

Mechanizm przyłączania i odłączania molekuł od powierzchni adsorbenta został po raz pierwszy opisany przez Irvinga Langmuira (Langmuir 1918). Przedstawił on model jednowarstwowej sorpcji cząsteczek opisujący dane doświadczalne dla zakresu wilgotności  $h < 0.1$ . Jego model opierał się na założeniu, że powierzchnia stałego adsorbenta ma wyróżnione miejsca zwane centrami aktywnymi, którymi mogą być ściany mikrokrystalitów, defekty sieciowe lub w przypadku adsorbentów złożonych, granice faz. Do każdego takiego centrum aktywnego może zaadsorbować (w wyniku adsorpcji fizycznej bądź chemicznej) jedna cząsteczka adsorbenta (powstaje warstwa monomolekularna). Langmuir przyjął, że cząsteczki zaadsorbowane na centrach adsorpcji nie oddziałują wzajemnie na siebie oraz nie wykazują ruchu translacyjnego (drganie, przemieszczanie się) w płaszczyźnie powierzchni adsorbenta. Proces adsorpcji ma charakter dynamicznej równowagi pomiędzy adsorpcją i procesem odwrotnym do adsorpcji – desorpcją, a energia adsorpcji jest stała i nie zależy od stopnia pokrycia powierzchni.

Zakładając, że liczba centrów aktywnych na powierzchni jest stała, proces adsorpcji można zapisać w postaci równania



gdzie  $A$  oznacza cząsteczki gazu,  $S$  - wolne centra aktywne, natomiast  $SA$  - zajęte centra aktywne. Równowagowy współczynnik sorpcji można zapisać jako

$$K = \frac{[SA]}{[A] \cdot [S]}. \quad (5)$$

Oznaczając  $\Theta$  jako stosunek części powierzchni zajętej do całkowitej powierzchni adsorbenta ( $0 < \Theta < 1$ ) i przyjmując, że  $[SA]$  jest proporcjonalne do pokrycia powierzchni



zaadsorbowanymi cząsteczkami (czyli jest proporcjonalne do  $\Theta$ ), podczas gdy  $[S]$  jest proporcjonalne do liczby miejsc niezapełnionych,  $(1 - \Theta)$ , natomiast  $[A]$  jest proporcjonalne do ciśnienia gazu  $p$ , można zapisać

$$K = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)p} \Rightarrow \Theta = \frac{K \cdot p}{1 + K \cdot p} \quad (6)$$

Istotnym jest fakt, że  $K$  jest wartością stałą tylko wtedy, gdy entalpia adsorpcji jest niezależna od stopnia pokrycia powierzchni. Współczynnik  $K$  opisujący równowagę między procesami sorpcji i desorpcji zależy m.in. od temperatury układu i ciśnienia par adsorbentu nad powierzchnią. Czynniki te wywierają przeciwny wpływ na stężenie adsorbentu, przykładowo pokrycie powierzchni można zwiększyć przez zwiększanie ciśnienia par adsorbentu, jednak będzie ono maleć, jeśli przy stałym ciśnieniu rosnąć będzie temperatura.

### 4.3.3 Izoterma Brunauer-Emmet-Taller (BET)

Model Langmuira ogranicza się do adsorpcji jednowarstwowej. Nie opisuje on m.in. zjawiska kondensacji występującego dla dużych ciśnień pary. W 1938 r. Brunauer, Emmet i Taller w oparciu o teorię Langmuira opracowali model adsorpcji wielowarstwowej (Brunauer i in. 1938). Podstawowym założeniem modelu BET jest możliwość zastosowania równania Langmuira do każdej warstwy adsorpcyjnej. Energie poszczególnych warstw są różne, przy czym energia wiązania do warstwy pierwszej jest o wiele większa niż do warstw kolejnych. Zgodnie z tą teorią przy adsorpcji z pary, cząsteczka, trafiająca na zajęte miejsce adsorpcyjne powierzchni adsorbentu, nie opuszcza go natychmiast, lecz tworzy krótkotrwały kompleks adsorpcyjny. Ze wzrostem ciśnienia pary (gdy  $p$  zbliża się do ciśnienia pary nasyconej  $p_0$ ) ilość niezajętych miejsc na powierzchni adsorbentu zmniejsza się. Zmniejsza się też ilość miejsc aktywnych zajętych przez tylko jedną cząsteczkę adsorbentu, ponieważ tworzą się wielokrotne kompleksy adsorpcyjne. Rysunek 4 przedstawia model adsorpcji sekwencyjnej, przyjęty w teorii BET.

Wyprowadzenie wzoru na równanie izotermy wymaga rozróżnienia entalpii adsorpcji do pierwszej warstwy (absorbującej na sposób opisany przez Langmuira), tzn.  $E_{chem}$  oraz ciepła kondensacji (równego ciepłu parowania) wszystkich kolejnych warstw,  $E_{kond}$ . Szybkość adsorpcji na  $i$ -tej warstwie (czystemu adsorbentowi odpowiada indeks 0) jest równa

$$R_{ad}^{(i)} = k_{ad}^{(i)} \cdot p \cdot S_{(i)} \quad (7)$$

gdzie  $p$  –to ciśnienie, natomiast  $S_{(i)}$  to pole nieobsadzonej powierzchni dla  $i$ -tej warstwy. Szybkość desorpcji z tej warstwy jest z kolei równa

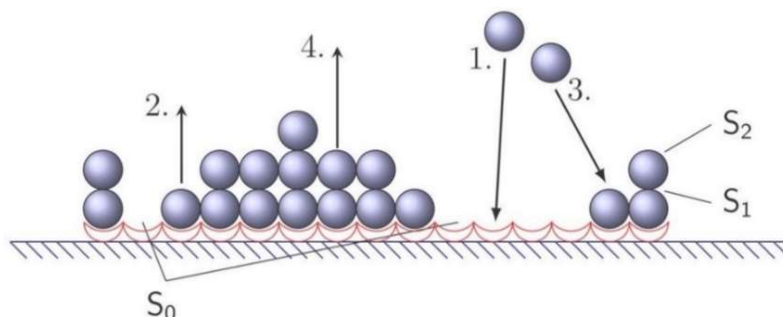
$$R_{des}^{(i)} = k_{des}^{(i)} \cdot S_{(i)} \cdot e^{-\frac{E_{(i)}}{kT}} \quad (8)$$

W stanie równowagi szybkości te są sobie równe, więc dla pierwszej warstwy i pierwotnych miejsc wiążących zachodzi związek:

$$k_{ad}^{(1)} \cdot P \cdot S_{(0)} = k_{des}^{(1)} \cdot S_{(1)} \cdot e^{-\frac{E_{(1)}}{kT}} \quad (9)$$

Cztery procesy mogą zmienić powierzchnię  $S_1$  (patrz Rys. 4):

1. adsorpcja cząsteczki na powierzchni adsorbenta  $R_{ad}^{(1)} = k_{ad}^{(1)} p S_0$
2. desorpcja cząsteczki z pierwszej warstwy  $R_{des}^{(1)} = k_{des}^{(1)} \cdot S_{(1)} \cdot e^{-\frac{E_{(1)}}{kT}}$
3. adsorpcja cząsteczki na pierwszą warstwę  $R_{ad}^{(2)} = k_{ad}^{(2)} p S_0$
4. desorpcja cząsteczki z drugiej warstwy  $R_{des}^{(2)} = k_{des}^{(2)} \cdot S_{(2)} \cdot e^{-\frac{E_{(2)}}{kT}}$ .



Rysunek 4 Procesy sorpcji i desorpcji dla pierwszych dwóch warstw adsorbentu opisane przez model BET

W stanie równowagi pole powierzchni  $S_l$  się nie zmienia, więc efekt procesów 1 i 4 (zwiększenie  $S_l$ ) jest kompensowany przez procesy 2 i 3:

$$k_{ad}^{(1)} p S_{(0)} + k_{des}^{(2)} S_{(2)} e^{-\frac{E_{(2)}}{kT}} = d = k_{des}^{(1)} S_{(1)} e^{-\frac{E_{(1)}}{kT}} + k_{ad}^{(2)} p S_{(0)}. \quad (10)$$

Po odjęciu równania (9) od równania (10) otrzymuje się

$$k_{des}^{(2)} S_{(2)} e^{-\frac{E_{(2)}}{kT}} = k_{ad}^{(2)} S_{(1)} p \quad (11)$$

Analizując w ten sposób kolejne warstwy można dojść do ogólnego wyrażenia

$$k_{des}^{(i+1)} S_{(i+1)} e^{E_{(i+1)}/kT} = k_{ad}^{(i+1)} S_{(i)} p \quad (12)$$

Całkowitą objętość zaadsorbowanej wody można uzyskać przez przemnożenie powierzchni zajętej dla każdej warstwy przez liczbę warstw znajdujących się pod nią oraz przez objętość właściwą na jednostkę powierzchni:

$$V_{total} = V_0 \sum_{i=1}^{\infty} i S_{(i)}. \quad (13)$$

Stosunek całkowitej objętości zaadsorbowanej substancji  $V_{total}$  do objętości monowarstwy  $V_{mono}$  (czyli pokrycie  $\Theta$ ) jest równy

$$\Theta = \frac{V_{total}}{V_{mono}} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} i S_{(i)}}{\sum_{i=1}^{\infty} S_{(i)}}. \quad (14)$$

By móc wyznaczyć wartości tych sum konieczne jest dokonanie kilku założeń, mianowicie wszystkie energie adsorpcji począwszy od drugiej warstwy będą sobie równe ( $E_L$ ) oraz wszystkie stosunki szybkości sorpcji/desorpcji będą stałe i sobie równe

$$\frac{k_{des}^{(2)}}{k_{ad}^{(2)}} = \frac{k_{des}^{(3)}}{k_{ad}^{(3)}} = \dots = \frac{k_{des}^{(n)}}{k_{ad}^{(n)}} = g, \quad (15)$$

co jest typowe dla cieczy. Pierwsza warstwa jest analizowana odrębnie, bo szybkości sorpcji/desorpcji oraz energia adsorpcji na niej są istotnie różne. Definiując

$$x = \frac{p}{g} \exp\left(\frac{E_L}{RT}\right) \quad y = \frac{k_{des}^{(1)}}{k_{ad}^{(1)}} \exp\left(\frac{E_1}{RT}\right) \quad (16)$$

oraz wprowadzając stałą  $c=y/x$  można wyrazić kolejne pola zajętej powierzchni jako:

$$\begin{aligned} S_1 &= y S_0 \\ S_2 &= x S_1 = x y S_0 \\ S_3 &= x S_2 = x^2 y S_0 \\ &\vdots \\ S_i &= x S_{i-1} = x_1^{-i-1} S_1 = c x^i S_0. \end{aligned} \quad (17)$$

Wtedy pokrycie powierzchni  $\Theta$  będzie równe

$$\Theta = \frac{V_{total}}{V_{mono}} = \frac{c S_0 \sum_{i=1}^{\infty} i x^i}{S_0 (1 + c \sum_{i=1}^{\infty} x^i)} = \frac{c \sum_{i=1}^{\infty} i x^i}{1 + c \sum_{i=1}^{\infty} x^i}. \quad (18)$$

Sumy szeregów geometrycznych z powyższego równania wynoszą:

$$\sum_i x_i = \frac{x}{1-x}, \quad (19)$$

$$\sum_i ix^i = x \sum_i ix^{i-1} = x \frac{d}{dx} \sum_i x^i = x \frac{d}{dx} \left( \frac{x}{1-x} \right) = \frac{x}{(1-x)^2}.$$

Równanie (18) można więc przepisać w postaci

$$V_{total} = V_{mono} \frac{c \frac{x}{(1-x)^2}}{1 + c \frac{x}{1-x}} = V_{mono} \frac{cx}{(1-x)(1-x+cx)}. \quad (20)$$

Można przyjąć, że nieznaną wielkość  $x$  jest równa ciśnieniu względnemu:  $x=p/p_0$ . Spełniony jest wtedy warunek, że dla  $p=p_0$  wartość  $V_{total}$  staje się nieskończona ( $x \rightarrow 1$ ). Taka postać równania izotermy BET najczęściej jest najczęściej spotykana w literaturze przedmiotu (Basu i in. 2006).

Warto wspomnieć o dwóch przypadkach granicznych:

- $c \gg 1$ : ciepło adsorpcji pierwszej warstwy jest duże w porównaniu z entalpią kondensacji i adsorpcja do drugiej warstwy zachodzi dopiero wtedy, gdy warstwa pierwsza jest całkowicie zapełniona; jeśli dodatkowo  $p \ll p_0$ , izoterma BET przechodzi w izotermę Langmuira;

- $c \ll 1$ :  $E_1$  jest mniejsze lub porównywalne z  $E_L$ , więc adsorpcja wielowarstwowa zachodzi nawet gdy pierwsza warstwa jest niezapełniona.

Izoterma BET ma kształt sigmoidy, w obszarze zapełniania się monowarstwy wzrost adsorpcji zmniejsza się z podwyższeniem ciśnienia (na wykresie izotermy powstaje odcinek wypukły), ale przy dalszym podwyższeniu ciśnienia tempo adsorpcji powinno wzrastać - adsorpcja staje się wielomolekularna i izoterma przechodzi przez punkt przegięcia.

### 4.3.4 Izoterma GAB

Na ogół model BET trafnie opisuje sorpcję wody z fazy gazowej w zakresie wilgotności względnej do  $h \approx 0.45$ . Założenie, że powierzchnia adsorbenta jest jednolita oraz nie istnieją oddziaływania między cząsteczkami adsorbentu, jest rzadko spełniane dla materiałów heterogenicznych, co znacznie ogranicza wykorzystanie izotermi BET do wyznaczenia ilości wody wysycającej miejsca pierwotne.

Rozwinięciem teorii BET są trójparametrowe równania izoterm, wyprowadzone niezależnie przez kilku badaczy. Najpowszechniejszą ich wersją jest model Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), zakładający, że ciepło adsorpcji dla drugiej i kolejnych warstw adsorbenta jest inne, niż ciepło parowania/kondensacji cząsteczek w fazie ciekłej,  $L$ , (Aguerre i in. 1989). W ogólności można to zapisać jako

$$E_i = L + RTf(i) \quad (21)$$

gdzie  $f(i)$  jest funkcją numeru warstwy. Wstawiając tę zależność do wcześniej wyprowadzonego równania (12) otrzymuje się

$$k_{ads}^{(i+1)} S_{(i)} p = \frac{k_{des}^{(i+1)} S_{(i+1)}}{k(i)} \exp\left(-\frac{L}{RT}\right), \quad (22)$$

gdzie dokonano podstawienia  $k(i) = \exp[f(i)]$ . Zdefiniowany na potrzeby izotermi BET współczynnik  $x$  jest więc teraz równy

$$x = \frac{p}{g} \exp\left(\frac{E_i}{RT}\right) = \frac{p}{g} k(i) \exp\left(\frac{L}{RT}\right) = wk(i), \quad (23)$$

gdzie stała  $w$  oznacza  $w = \frac{p}{g} \exp\left(\frac{L}{RT}\right)$ . Równanie (17) ma więc teraz postać

$$S_i = S_{i-1} w_i = S_{i-1} x k(i) = S_0 y x^{i-1} \prod_{j=2}^i k(j) = S_0 c x^i \prod_{j=2}^i k(j), \quad (24)$$

gdzie stała

$$c = \frac{y}{x} = \frac{k_{ad}^{(1)}}{k_{des}^{(1)}} g \exp\left(\frac{E_1 - L}{RT}\right) \quad (25)$$

ma takie samo znaczenie fizyczne, jak w modelu BET. Stosunek całkowitej objętości sorbatu do objętości potrzebnej do pokrycia monowarstwy jest w przypadku modelu GAB równy

$$\frac{V_{total}}{V_{mono}} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} iS_i}{\sum_{i=1}^{\infty} iS_i} = \frac{c[x + \sum_{i=2}^{\infty} ix^i \prod_{j=2}^i k(j)]}{1 + c[x + \sum_{i=2}^{\infty} x^i \prod_{j=2}^i k(j)]} =$$

$$= x \frac{d}{dx} \ln \left\{ 1 + c \left[ x + \sum_{i=2}^{\infty} x^i \prod_{j=2}^i k(j) \right] \right\} \quad (26)$$

Zakładając, że  $k(j)$  jest wyłącznie funkcją numeru warstwy sorpcyjnej, można rozważyć trzy szczególne postaci izotermy wyznaczone z równania (26):

1.  $k(j) = k = constant$ ,
2.  $k(j) = j/(j - 1)$ ,
3.  $k(j) = (j - 1)/j$ .

W drugim i trzecim przypadku ciepło sorpcji zmienia się w zależności od warstwy (odpowiednio maleje i rośnie) i zmierza asymptotycznie do wartości  $L$ . Znając zależność  $k$  od numeru warstwy można wyprowadzić trzy różne typy izoterm.

1. Przy założeniu  $k = constant$  ciepło adsorpcji jest, począwszy od drugiej warstwy, stałe, a więc iloczyn w równaniu (26) jest równy

$$\prod_{j=2}^i k(j) = k^{i-1} \quad (27)$$

więc całe wyrażenie w nawiasach sprowadza się do sumy szeregu

$$\sum_{i=1}^{\infty} x^i k^{i-1} = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^{\infty} (xk)^i = \frac{1}{k} \left( \frac{kx}{1 - kx} \right). \quad (28)$$

Ostatecznie izoterma przyjmuje postać

$$V_{total} = V_{mono} \frac{ch}{(1 - kh)(1 + (c - k)h)}$$

$$= \frac{c'kh}{(1 - kh)(1 + (c' - 1)kh)} \quad (29)$$

gdzie stała  $c'$  jest powiązana ze stałą  $c$  z równania BET:

$$c' = \frac{c}{h} = \frac{k_{ad}^{(1)}}{k_{des}^{(1)}} g \exp((E_1 - (L + RT \ln k))/RT). \quad (30)$$

W przypadku, gdy ciepło adsorpcji drugiej warstwy jest równe  $L$  (czyli dla  $k = 1$ ) izoterma ta sprowadza się do modelu BET.

2. Jeżeli ciepło adsorpcji maleje z każdą kolejną warstwą zgodnie z zależnością  $k(j) = j/(j - 1)$ , to iloczyn i suma w równaniu (26) są kolejno równe

$$\prod_{j=2}^i \frac{j}{j-1} = i, \quad (31)$$

$$\sum_i^{\infty} ix^i = x \frac{d}{dx} \sum_i^{\infty} x^i = \frac{x}{(1-x)^2}.$$

Równanie izotermi ma więc postać

$$V_{total} = V_{mono} \frac{ch(1+h)}{(1-h)[(1-h)^2 + ch]}. \quad (32)$$

3. Jeżeli zaś ciepło adsorpcji rośnie z każdą kolejną warstwą zgodnie z zależnością  $k(j) = (j - 1)/j$ , to iloczyn i suma w równaniu (26) są odpowiednio równe

$$\prod_{j=2}^i \frac{j-1}{j} = \frac{1}{i}, \quad (33)$$

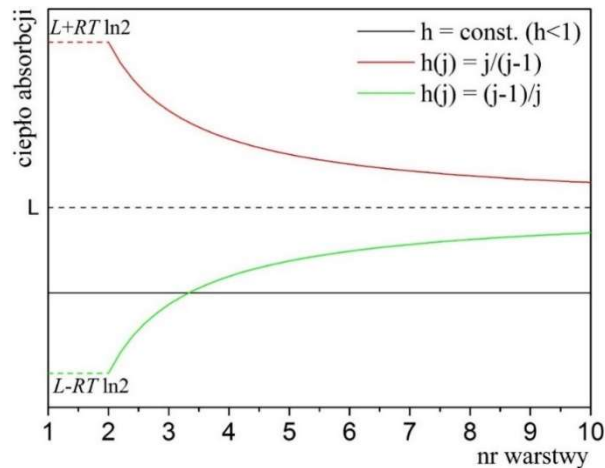
$$\sum_{i=2}^{\infty} \frac{x^i}{i} = -\ln(1-x) \quad \text{dla } -1 \leq x < 1,$$

więc izoterma wyraża się równaniem

$$V_{total} = V_{mono} \frac{ch}{(1-h)(1-c \ln(1-h))}. \quad (34)$$

W analizie sorpcji materiałów biologicznych najczęściej stosowana jest pierwsza wersja izotermi GAB, która zakłada stałe ciepło sorpcji dla drugiej i kolejnych warstw adsorbentu (Harańczyk 2003; Black & Pritchard 2002). Dodatkowa względem modelu BET stała  $k$  jest miarą różnicy między potencjałami chemicznymi cząsteczek drugiej fazy adsorpcji i cząsteczek fazy ciekowej adsorbenta.

Model GAB opisuje w zadowalający sposób dane doświadczalne sorpcji z fazy gazowej dla wilgotności względnej atmosfery  $h < 0.9$ . Dalsze próby rozszerzenia jego stosowalności uwzględniały zniesienie niektórych założeń i wprowadzenie dodatkowych parametrów, np. opisujących adsorpcję ograniczoną do  $n$  warstw, czy pęcznienie materiału, jednak większość z owych modeli nie poprawiała w znaczący sposób jakości dopasowań do danych eksperymentalnych (Lewicki 1998).



Rysunek 5 Ciepło adsorbacji wody w funkcji numeru warstwy dla analizowanych modeli GAB (na podstawie (Aguerre i in. 1989))

### 4.3.5 Izoterma Denta

W 1977 r. R. Dent opublikował opis mechanizmu sorpcji wielowarstwowej, który choć matematycznie jest równoważny modelowi GAB, jednak definicja parametrów i ich znaczenie fizyczne jest inne (Dent 1977). Dent również rozważył istnienie pierwotnych i wtórnych miejsc aktywnych, jednak nie dywersyfikując wody związanej do drugiej i do dalszych warstw, zatem użyta przez niego stała kinetyczna  $b$  może opisywać zarówno wiązanie w wodzie swobodnej, jak i na powierzchni kropli. Liczba molekuł przypadających średnio na jedno miejsce wiążące wynosi:

$$V_{total} = V_{mono} \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)}, \quad (35)$$

stała  $b_1$  określa względne pokrycie pierwotnych miejsc wiążących dla danego  $h$ , a stała  $b$ , zmieniająca się w zakresie 0-1, jest stosunkiem pokrycia warstwy  $(n+1)$  do pokrycia warstwy  $n$  dla  $h = 1$ . Wielkość  $1/b_1|_{h=1}$  określa stosunek liczby nieobsadzonych miejsc aktywnych do liczby miejsc związanych z jedną molekułą wody dla wilgotności względnej  $h = 1$ , a więc jest miarą hydrofilowości powierzchni.

### 4.3.6 Izoterma GDW

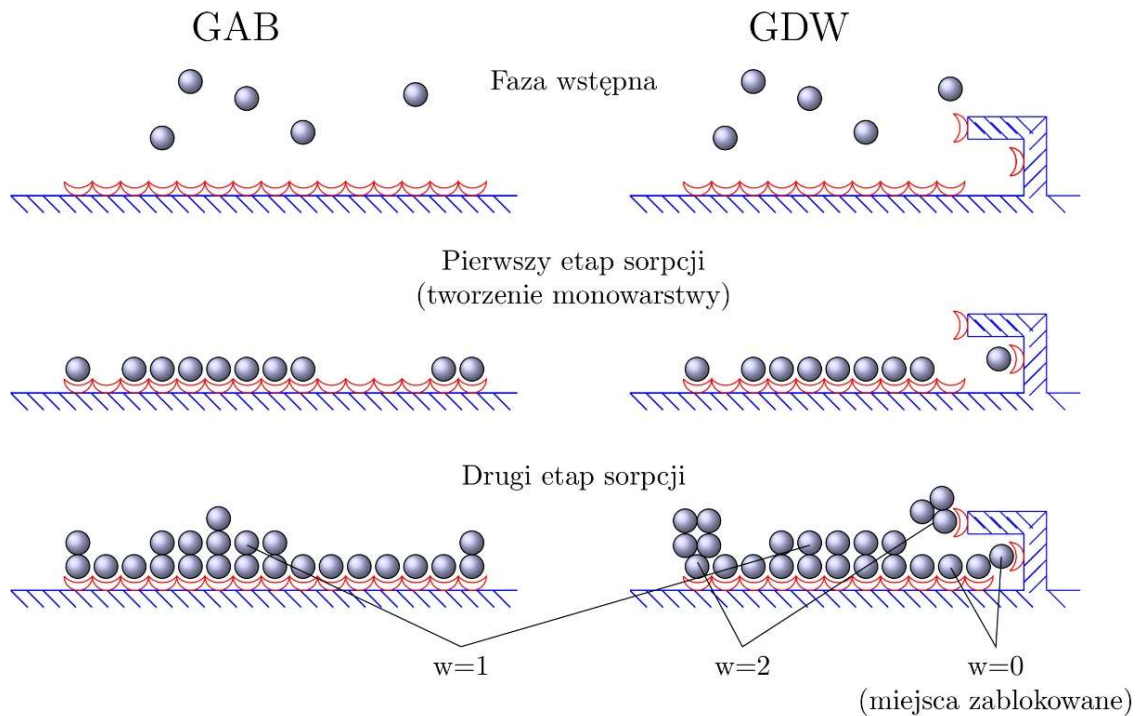
Jednym z ostatnio opracowanych modeli sorpcji, bazujących na izotermie GAB, jest uogólniony model D’Arcy’ego-Watta (Generalized D’Arcy-Watt, model GDW).



Przedstawiony w 1970 r. oryginalny model D’Arcy’ego i Watta zakładał, że sorpcja (wody) zachodzi niezależnie na silnie (grupy hydrofilowe) oraz słabo wiążących miejscach aktywnych. Co więcej, wprowadzono uproszczony opis wielowarstwowej adsorpcji na wtórnych miejscach aktywnych, jaki zakładał wiązanie na nich klastrów wody jeszcze przed tym, jak zostaną wysyczone pierwotne miejsca aktywne (D’Arcy & Watt 1970). Uogólnienie tego modelu zaprezentował Furmaniak i wsp. (Furmaniak, A. P. Terzyk, Gauden, i in. 2007; Furmaniak, A. P. Terzyk, Czepirski, i in. 2007; Furmaniak i in. 2009). Izoterma GDW zakłada istnienie pierwotnych miejsc aktywnych na powierzchni adsorbenta. Każde centrum może zaadsorbować tylko jedną cząsteczkę wody, która może stać się wtórnym miejscem aktywnym dla kolejnych cząsteczek. Główna różnica polega na tym, że nie wszystkie zaadsorbowane cząsteczki wody stają się miejscami wtórnymi, dopuszczalna jest też sorpcja więcej niż jednej cząsteczki wody na jednym miejscu aktywnym (patrz Rys. 6).

Równanie izotermy GDW zawiera więc dodatkowy parametr  $w$ , który mówi jaka część cząsteczek wody zaadsorbowanych na pierwotnych miejscach aktywnych staje się miejscami wtórnymi:

$$V_{total} = V_{mono} \frac{Kh}{1 + Kh} \frac{1 - k(1 - w)h}{1 - kh}. \quad (36)$$



Rysunek 6 Schematyczne porównanie mechanizmów sorpcji z modeli GAB i GDW (na podstawie (Furmaniak, A. Terzyk, i in. 2007))

Pozostałe parametry modelu mają znaczenie analogiczne do wcześniej wprowadzonych,  $K$  i  $k$ , i opisują szybkość adsorpcji na miejscach aktywnych, odpowiednio pierwotnych i wtórnych. Można rozważyć trzy scenariusze adsorpcji w zależności od wartości parametru  $w$ :

1.  $w < 1$  - nie wszystkie cząsteczki wody zaadsorbowane na powierzchni stają się wtórnymi miejscami aktywnymi (liczba wtórnych miejsc aktywnych jest mniejsza, niż liczba pierwotnych miejsc aktywnych),
2.  $w = 1$  - do każdej cząsteczki wody zaadsorbowanej do powierzchni zostaje przyłączona dokładnie jedna kolejna cząsteczka, a model upraszcza się do izotermi GAB i zachodzą następujące związki między parametrami izotermi (Furmaniak, A. Terzyk, i in. 2007):

$$V_{mono}^{GAB} = V_{mono}^{GDW} \frac{K^{GDW}}{K^{GDW} + k^{GDW}},$$

$$c^{GAB} = 1 + \frac{K^{GDW}}{k^{GDW}},$$
(37)

$$k^{GAB} = k^{GDW}.$$

3.  $w > 1$  - średnio więcej niż jedna cząsteczka adsorbuje wtórnie na cząsteczce zaadsorbowanej na pierwotnym miejscu aktywnym.

Model GDW znalazł zastosowanie w opisie sorpcji wody na heterogenicznych materiałach pochodzenia biologicznego np. drewnie czy produktach żywnościowych (Furmaniak i in. 2009; Agudelo-Laverde i in. 2014; Olek i in. 2013)

# 5 Magnetyczny Rezonans Jądrowy

Metody Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (oznaczanego dalej jako MRJ lub NMR) są jednymi z najczęściej stosowanych technik badania dynamiki wody w różnym stanie. Z eksperymentu protonowego MRJ można wyciągnąć zarówno jakościowe, jak i ilościowe wnioski dotyczące wody.

Jedną z ważniejszych zalet technik MRJ jest jej nieinwazyjność badania dynamiki molekularnej czy otoczenia chemicznego w próbkach biologicznych (Villa i in. 1983; Black & Pritchard 2002). Ich właściwości hydratacyjne są zazwyczaj badane rezonansem na jądрах  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  lub  $^{17}\text{O}$  poprzez obserwację procesów relaksacyjnych (Aroulmoji i in. 2012).

## 5.1 Moment pędu i moment magnetyczny jądra

Klasycznie moment pędu  $\vec{L}$  cząstki o masie  $m$  o pędzie  $\vec{p}$  i prędkości  $\vec{v}$  dany jest wyrażeniem

$$\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p} = m(\vec{r} \times \vec{v}), \quad (38)$$

gdzie  $\vec{r}$  jest wektorem wodzącym. Przechodząc do opisu kwantowego wprowadza się operatory

$$p \rightarrow -i\hbar, \quad r \rightarrow r, \quad (39)$$

gdzie  $\hbar$  jest zredukowaną stałą Plancka. Moment pędu przyjmuje zatem postać

$$\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p} = -i\hbar \vec{r} \times \nabla \Rightarrow L_i = \varepsilon_{ijk} x_j p_k. \quad (40)$$

Składowe operatorów położenia i pędu spełniają kanoniczną relację komutacyjną:

$$[x_j, p_k] = i\hbar \delta_{jk}. \quad (41)$$

Korzystając z tych informacji można wyprowadzić inne relacje komutacyjne:

$$\begin{aligned} [L_m, x_n] &= i\hbar \varepsilon_{mnq} x_q \\ [L_m, p_n] &= i\hbar p_q \\ [L_m, L_n] &= i\hbar \varepsilon_{mnq} L_q \\ [L_m, L^2] &= 0. \end{aligned} \quad (42)$$

Dla jąder o niezerowym momencie pędu zachodzi relacja między momentem magnetycznym, a tymże momentem pędu:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L}, \quad (43)$$

gdzie  $\gamma$  jest charakterystycznym dla każdego jądra współczynnikiem żyromagnetycznym równym  $g_n \frac{e}{2m_p} = \frac{g_n \mu_n}{\hbar}$ , gdzie  $m_p$  oznacza masę protonu,  $g_n$  to czynnik Landego, natomiast  $\mu_n$  to magneton jądrowy.

Oprócz momentu pędu wynikającego z ruchu w przestrzeni, elektrony i niektóre jądra atomowe mają własny kręt - spin. Spin elektronu jest wartością stałą i wynosi 1/2. Operator spinowy  $I$  spełnia te same relacje komutacyjne, co operator momentu pędu (42). Składowe operatora zdefiniowanego jako  $I' = I\hbar$  mają wartości własne

$$m = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I, \quad (44)$$

gdzie  $I$  jest spinową liczbą kwantową.

Dipol magnetyczny umieszczony w zewnętrznym polu magnetycznym  $\vec{B}$  posiada energię potencjalną

$$E = -\vec{\mu}' \cdot \vec{B}, \quad (45)$$

moment siły działający na taki dipol jest równy

$$\vec{T} = -\vec{\mu}' \times \vec{B}. \quad (46)$$

Moment magnetyczny pętli z prądem  $I$  o powierzchni  $S$  jest równy

$$\mu' = IS. \quad (47)$$

Powyższy wzór można zastosować przy analizie ruchu elektronu wokół jądra. Jeśli  $v/2\pi r$  jest okresem obiegu elektronu po orbicie, to stosując wzór (47) otrzymuje się

$$\mu' = IS = -e \frac{v}{2\pi r} \pi r^2 = -\frac{1}{2} e v r. \quad (48)$$

Ponieważ wektor  $\vec{\mu}'$  jest prostopadły do płaszczyzny orbity, to uwzględniając (38) można zapisać

$$\vec{\mu}' = -\frac{e}{2m_e} \vec{K} = \gamma \vec{K}. \quad (49)$$

Ostatecznie można zapisać relację między momentem magnetycznym jądra  $\vec{\mu}$  a jego momentem pędu

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{K}, \quad (50)$$

a zastępując moment pędu operatorem spinowym  $I'$  otrzymuje się

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I}. \quad (51)$$

Hamiltonian jądra obdarzonego momentem magnetycznym  $\vec{\mu}$  umieszczonego w polu magnetycznym  $\vec{B}$  ma postać

$$\widehat{H}_z = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}. \quad (52)$$

Tu i w dalszej części pracy przyjęto konwencję, że pole  $\vec{B}_0$  jest skierowane wzdłuż osi  $z$ , w takiej sytuacji Hamiltonian sprowadzi się do

$$\widehat{H}_z = -B_0 \mu_z = -B_0 \gamma \hbar I_z. \quad (53)$$

Wartości własne operatora Hamiltona oddziaływania jądra z polem są iloczynami wartości własnych operatora  $I_z$  i czynnika  $(\gamma \hbar B_0)$  i wynoszą

$$E(m) = -B_0 \gamma \hbar m, \quad (54)$$

więc energia oddziaływania jest zdegenerowana  $2I+1$ -krotnie, a odległości między kolejnymi poziomami są równe

$$\Delta E = E(m) - E(m-1) = -\gamma \hbar B_0. \quad (55)$$

## 5.2 Magnetyzacja jądrowa

Mianem magnetyzacji określa się wypadkowy moment magnetyczny przypadający na jednostkę objętości próbki

$$M = \frac{\mu'}{V}. \quad (56)$$

Próbka paramagnetyka jądrowego umieszczona w polu magnetycznym  $B_0$  po pewnym czasie osiągnie stan równowagi, a obsadzenia poszczególnych poziomów energetycznych będą opisane statystyką Boltzmana, tzn.

$$N(m_i) = \frac{N}{2I+1} \exp\left(-\frac{E(m_i)}{k_B T}\right), \quad (57)$$

gdzie  $k_B$  jest stałą Boltzmana. Stosunek obsadzeń  $N_-$  i  $N_+$  stanów  $m=-1/2$  i  $m=+1/2$  jest zatem równy

$$\frac{N_-}{N_+} = \exp\left(\frac{E_{+1/2} - E_{-1/2}}{k_B T}\right). \quad (58)$$

Składowa magnetyzacji w kierunku osi  $z$  wynosi

$$M'_z = \sum \mu_z = \sum_m \mu_z(m)N(m), \quad (59)$$

a składowe poprzeczne uśredniają się do zera.

Ostatecznie moment magnetyczny pochodzący z częściowego uporządkowania jądrowych momentów w zewnętrznym polu magnetycznym jest równy

$$M' = \frac{\gamma^2 \hbar^2 B_0 N}{3k_B T} I(I + 1). \quad (60)$$

Stałą proporcjonalności między magnetyzacją (60) a polem  $B_0$ , czyli tzw. podatność magnetyczną, można zapisać jako

$$\chi_\infty = \frac{\gamma^2 \hbar^2 \mu_0 N_0}{3k_B T} I(I + 1), \quad (61)$$

gdzie  $N_0 = N/V$ .

### 5.3 Precesja Larmore'a i zjawisko MRJ

Po uwzględnieniu wzorów (46) oraz (49) zasadę zachowania momentu pędu  $\frac{d\vec{L}}{dt} = \vec{T}$  można zapisać jako

$$\frac{d}{dt} \vec{M} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0. \quad (62)$$

Przy przejściu do układu odniesienia wirującego z prędkością kątową  $\vec{\omega}$  prędkość punktu w punkcie  $\vec{r}$  transformuje się w następujący sposób:

$$\vec{v} = \vec{v}_a + \vec{\omega} \times \vec{r}, \quad (63)$$

gdzie  $\vec{v}_a$  jest prędkością tego punktu w układzie wirującym. Przyjmując, że  $\vec{r} = \vec{M}$ , prawdziwe jest:  $\vec{v}_a = \left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)_a$  oraz  $\vec{v} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0$ . Wstawiając je do (63) otrzymuje się wyrażenie na prędkość wektora magnetyzacji  $\vec{M}$  w wirującym układzie odniesienia

$$\frac{d}{dt} \vec{M} = \gamma \vec{M} \times \left( \vec{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma} \right). \quad (64)$$

Jeżeli prędkość układu jest równa  $\vec{\omega} = -\gamma \vec{B}_0 = \vec{\omega}_0$ , to wektor  $\vec{M}$  jest w nim nieruchomy  $\left(\frac{d\vec{M}}{dt} = 0\right)$ .

Jeżeli próbka zostanie umieszczona w polu składającym się ze stałego pola o indukcji  $B_0$  oraz wirującego z prędkością  $\vec{\omega}_e$  pola  $\vec{B}_1$ , to w układzie wirującym spiny odczuwają działanie pola efektywnego równego

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}_e}{\gamma} + \vec{B}_1. \quad (65)$$

Wokół tego pola zachodzić będzie precesja wektora magnetyzacji

$$\left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)_{\vec{\omega}_e} = \gamma\vec{M} \times \vec{B}_{eff}. \quad (66)$$

Jeżeli prędkość  $\vec{\omega}_e$  spełnia warunek rezonansu, czyli

$$\vec{\omega}_e = -\gamma\vec{B}_0 \quad (67)$$

to  $B_{eff} = B_1$  i precesja odbywa się wokół wektora pola  $\vec{B}_1$ . Kąt obrotu magnetyzacji względem jego kierunku (kąt nutacji) można wyznaczyć z zależności

$$\beta = \gamma\tau B_1, \quad (68)$$

gdzie  $\tau$  jest czasem działania pola  $\vec{B}_1$  (Hennel i Klinowski 2000).

## 5.4 Procesy relaksacyjne

Relaksacją nazywany jest powrót układu do stanu równowagi termodynamicznej po jego wcześniejszym z tej równowagi wytrąceniu. W metodzie MRJ wzbudzenie ma postać impulsu wysokiej częstotliwości, który obraca magnetyzację próbki względem pola  $B_0$ . Po jego zastosowaniu układ przechodzi do wyższego stanu energetycznego, natomiast po jego wyłączeniu - powraca do sytuacji wyjściowej.

Jednak pole  $B_0$  nie jest jedynym czynnikiem modyfikującym energię jądra - szereg innych oddziaływań o innej naturze może być traktowany jako perturbację oddziaływania zeemanowskiego. Pełny Hamiltonian jądra może zostać zapisany jako

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_J + \hat{H}_{CS} + \hat{H}_{DD} + \hat{H}_Q \quad (69)$$

gdzie kolejne wyrazy opisują oddziaływanie Zeemana, hamiltonian oddziaływań pośrednich (sprzężenie spinowo-spinowo), hamiltonian przesunięcia chemicznego (izotropowe przesunięcie chemiczne oraz anizotropia przesunięcia chemicznego), hamiltonian oddziaływań bezpośrednich (sprzężenie dipol-dipol) oraz hamiltonian oddziaływań kwadrupolowych. Najsilniejsze jest oddziaływanie zeemanowskie ( $\approx 10^8$  Hz), drugie w kolejności jest oddziaływanie kwadrupolowe (rzędu kilku MHz). Energia



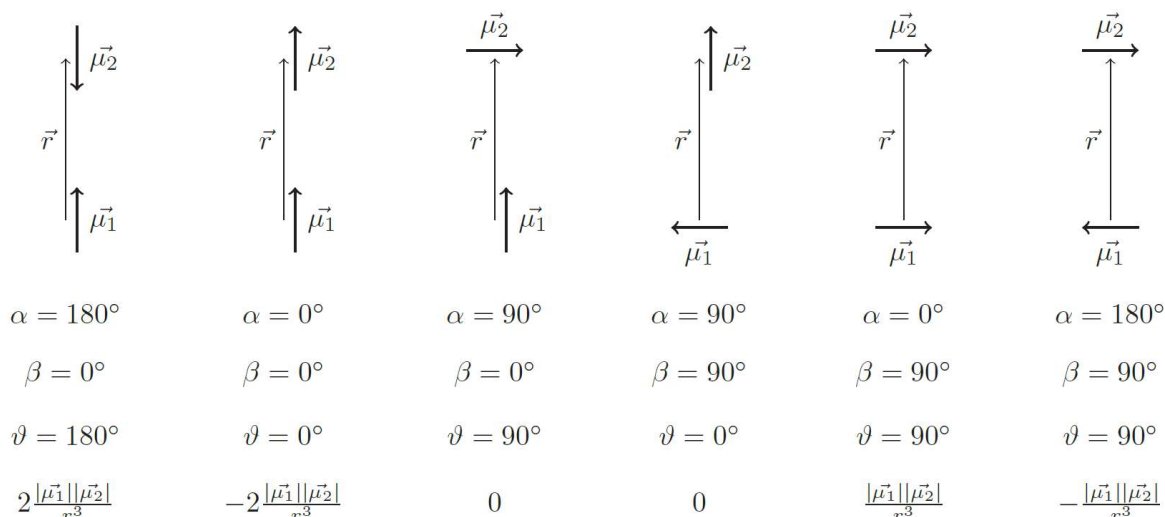
oddziaływań wynikających z przesunięcia chemicznego i sprzężenia dipolowego jest rzędu kHz, najsłabsze zaś jest oddziaływanie skalarne - jego wielkość określa się na dziesiątki Hz.

### 5.4.1 Oddziaływanie dipolowe

Oddziaływanie dipolowe ma największe znaczenie podczas protonowego NMR z powodu dużego momentu magnetycznego jąder  $^1\text{H}$  oraz wysokiej (zazwyczaj) zawartości protonów w badanych próbkach. Każde jądro posiadające niezerowy spin wytwarza pole magnetyczne odczuwalne w miejscu drugiego, energia oddziaływania takiego układu dipoli jest równa

$$E_{DD} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left( \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \right), \quad (70)$$

gdzie:  $\vec{\mu}_1, \vec{\mu}_2$  - momenty magnetyczne oddziałujących jąder,  $\vec{r}$ -wektor łączący dipole,  $r$  - odległość między nimi.



Rysunek 7 Energia oddziaływania dipoli magnetycznych oddalonych o odległość  $r$  dla wybranych orientacji względnych

Powyższe równanie może przepisać jako

$$E_{DD} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3} (\cos \alpha - 3 \cos \beta \cos \vartheta), \quad (71)$$

gdzie  $\alpha$  jest kątem między  $\vec{\mu}_1$  a  $\vec{\mu}_2$ ,  $\beta$  jest kątem między  $\vec{\mu}_1$  a  $\vec{r}$ , a  $\vartheta$  - kątem między  $\vec{\mu}_2$  a  $\vec{r}$ . Rysunek 7 pokazuje zależność wielkości oddziaływania dipolowego od wzajemnej orientacji oddziałujących dipoli dla sześciu szczególnych przypadków.

Dla jąder o spinie  $1/2$  tylko dwie orientacje są dozwolone, więc kąt  $\alpha$  może być równy tylko  $0^\circ$  lub  $180^\circ$ . Kąty  $\beta$  i  $\vartheta$  są ze sobą związane i można wyrazić je przez kąt  $\theta$

między  $\vec{r}$  a  $\vec{B}_0$ . Rysunek 8 przedstawia energie oddziaływania dipolowego dla dwóch takich spinów, dla dowolnego kąta  $\theta$ . Wiedząc, że

$$\mu_{iz} = m_i \gamma_i \hbar, \quad (72)$$

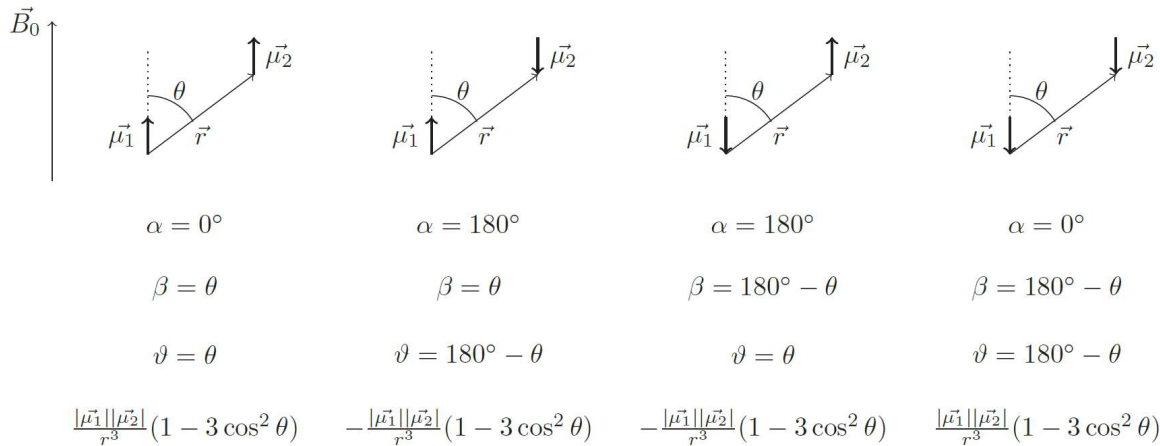
można następująco uprościć wyrażenie na energię oddziaływania dipolowego

$$\begin{aligned} E_{DD} &= \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\mu_{1z}\mu_{2z}}{r^3} (1 - 3\cos^2 \theta) = m_1 m_2 \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2}{r^3} (1 - 3\cos^2 \theta) = \\ &= m_1 m_2 J_D, \end{aligned} \quad (73)$$

gdzie wprowadzono oznaczenia

$$\begin{aligned} J_D &= D(1 - 3\cos^2 \theta) \\ D &= \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2}{r^3} \hbar^2. \end{aligned} \quad (74)$$

Parametr  $J_D$  opisuje zależne od orientacji rozszczepienie dipolowe, a  $D$  jest niezależną od pola magnetycznego stałą sprzężenia dipolowego.



Rysunek 8 Energia oddziaływania dipoli magnetycznych  $\mu_1$  i  $\mu_2$  odpowiadających jądrom o spinie  $1/2$

## 5.4.2 Oddziaływanie kwadrupolowe

W przypadku jąderek o spinie większym niż  $1/2$  należy uwzględnić w rozważaniach oddziaływanie kwadrupolowe wynikające z niezerowego kwadrupolowego momentu elektrycznego takich jąderek. Moment ten oddziałuje z gradientem pola elektrycznego (*Electric Field Gradient*, EFG) wygenerowanym przez anizotropowy rozkład ładunku w jądrze. Takie oddziaływanie momentu kwadrupolowego z EFG jest określane mianem sprzężenia kwadrupolowego, a jądra o spinie  $\geq 1$  - mianem jąderek kwadrupolowych.

Gradient pola elektrycznego wywołany zewnętrznymi (względem jądra) ładunkami można wyznaczyć przez pochodne potencjału elektrycznego  $V$  liczoną w jądrze. Po ustaleniu środka układu współrzędnych w miejscu jądra można zapisać te pochodne jako

$$V_{jk} = \frac{\partial^2 V}{\partial r_j \partial r_k} \Big|_0, \quad (75)$$

gdzie  $\{r_i\} = \{x, y, z\}$ . Korzystając z tego, że  $V_{ij} = V_{ji}$  oraz z równania Laplace'a

$$\sum_{i=x,y,z} V_{ii} = 0, \quad (76)$$

można opisać EFG jako rzeczywisty, symetryczny, bezśladowy tensor  $3 \times 3$ . Taki tensor może zawsze zostać zdiagonalizowany poprzez właściwy wybór osi, tzw. osi głównych. Po takim przekształceniu można zdefiniować

$$eq = V_{zz} \quad (77)$$

$$\eta = \frac{V_{yy} - V_{xx}}{V_{yy} + V_{xx}} = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}. \quad (78)$$

Parametr  $\eta$  jest określany jako współczynnik asymetrii,  $e$  jest ładunkiem elementarnym, a  $q$  jest ładunkiem jądra. Osie główne dobiera się tak, by  $0 \leq \eta \leq 1$ , a więc by

$$|V_{xx}| \leq |V_{yy}| \leq |V_{zz}|. \quad (79)$$

Klasycznie, energia oddziaływania jest równa

$$E_q = \frac{1}{6} \sum_{i,j=x,y,z} V_{ij} Q_{ij}; \quad (80)$$

wprowadzając opis stanu jądrowego przez momenty pędu można zaś zapisać (Suits 2006)

$$\begin{aligned} H_q &= \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} [3I_z^2 - I^2 + \eta(I_x^2 - I_y^2)] = \\ &= \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} \left[ 3I_z^2 - I^2 + \eta \frac{I_+^2 - I_-^2}{2} \right]. \end{aligned} \quad (81)$$

Dla jąder o spinie 1 (należą do nich  $^2\text{H}$ ,  $^6\text{Li}$  i  $^{14}\text{N}$ ) można wyznaczyć poziomy energetyczne wynikające z rozszczepienia kwadrupolowego:

$$E_0 = -\frac{2}{3} h a_{qcc} \quad (82)$$

$$E_{\pm} = (3 \pm \eta) h a_{qcc},$$

gdzie parametr

$$a_{qcc} = \frac{e^2 q Q}{4} \quad (83)$$

jest stałą sprzężenia kwadrupolowego.

### 5.4.3 Ruch wektora magnetyzacji

Ruchu wektora magnetyzacji  $\vec{M}$  pod wpływem pola  $\vec{B}_0$  oraz  $\vec{B}_1$  jest złożeniem ruchu precesyjnego i relaksacyjnego, a jego analizę umożliwia układ równań Blocha. Zmianę magnetyzacji w czasie można zapisać jako

$$\frac{dM}{dt} = \omega(t) \times M(t) - [R][M(t) - M_\infty], \quad (84)$$

gdzie  $R$  jest macierzą rotacji

$$R = \begin{bmatrix} \frac{1}{T_2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{T_2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{T_1} \end{bmatrix} \quad (85)$$

a  $M_\infty$  jest wartością równowagową składowej magnetyzacji wzdłuż osi  $z$ . Wyraz  $[R][M(t) - M_\infty]$  opisuje zanik magnetyzacji w płaszczyźnie  $xy$  i odrost składowej  $M_z(t)$  ze stałymi czasowymi  $T_1$  i  $T_2$ .

Rozpisanie tego równania na składowe daje

$$\begin{bmatrix} \frac{dM_x(t)}{dt} \\ \frac{dM_y(t)}{dt} \\ \frac{dM_z(t)}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} [M_x(t)\omega_y(t) - M_y(t)\omega_z(t)] - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ [M_x(t)\omega_y(t) - M_y(t)\omega_z(t)] - \frac{M_y(t)}{T_2} \\ [M_y(t)\omega_x(t) - M_x(t)\omega_y(t)] - \frac{[M_z(t) - M_\infty]}{T_1} \end{bmatrix}. \quad (86)$$

Zakładając, że pole magnetyczne jest statyczne, równanie to upraszcza się do

$$\begin{bmatrix} \frac{dM_x(t)}{dt} \\ \frac{dM_y(t)}{dt} \\ \frac{dM_z(t)}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -M_y(t)\omega_0 - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ M_x(t)\omega_0 - \frac{M_y(t)}{T_2} \\ -\frac{[M_z(t) - M_\infty]}{T_1} \end{bmatrix} \quad (87)$$

Ruch wektora magnetyzacji będzie więc opisany zależnością

$$\begin{bmatrix} M_x(t) \\ M_y(t) \\ M_z(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (M_x(0) \cos \omega_0 t - M_y(0) \sin \omega_0 t) e^{-\frac{t}{T_2}} \\ (M_y(0) \cos \omega_0 t - M_x(0) \sin \omega_0 t) e^{-\frac{t}{T_2}} \\ M_z(0) e^{-\frac{t}{T_1}} + M_\infty \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \end{bmatrix}. \quad (88)$$

#### 5.4.4 Relaksacja podłużna

Powrót składowej  $M_z$  do wartości początkowej, czyli relaksacja podłużna, bywa określany jako relaksacja spin - sieć, ponieważ jest wynikiem oddziaływania wzbudzonych jąder z otoczeniem. Energia oddziaływania spinów z polem  $B_0$  jest proporcjonalna do składowej  $M_z$

$$E = -M_z B_z, \quad (89)$$

dlatego relaksacja podłużna jest związana z wymianą energii (energii kinetycznej cząsteczek w próbce) między układem spinów a otoczeniem. Parametrem charakteryzującym relaksację spin-sieć jest czas  $T_1$  - czas relaksacji podłużnej, po którym składowa  $M_z$  odrasta od 0 do 63% swojej równowagowej wartości.

#### 5.4.5 Relaksacja poprzeczna

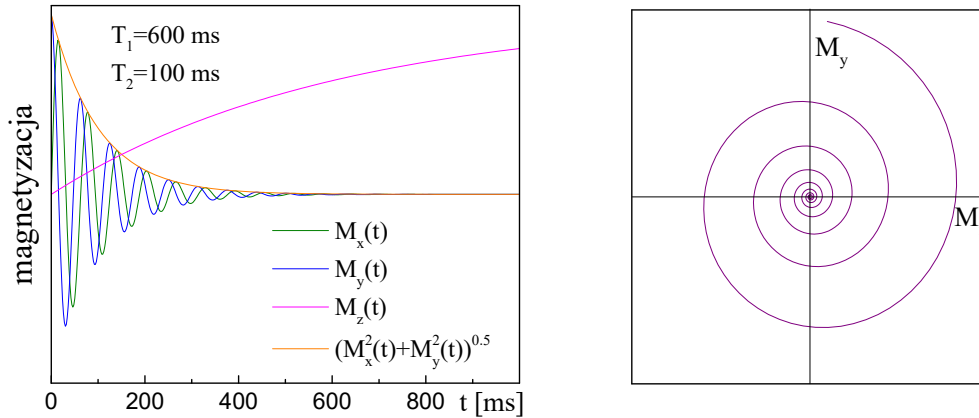
Po poddaniu próbki działaniu pola  $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$  w warunkach rezonansu pojawi się składowa poprzeczna magnetyzacji:

$$M_{xy} = M_x + iM_y. \quad (90)$$

Zanik składowej  $M_{xy}$  wektora magnetyzacji to relaksacja poprzeczna będąca skutkiem zaniku zgodności faz precesujących jąder poprzez przejścia kwantowe między spinami tego samego rodzaju, stąd inna nazwa - relaksacja spin-spin. Ogólna wartość energii spinów układu pozostaje jednak stała. Ruch składowej  $M_{xy}$  opisuje równanie:

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2}, \quad (91)$$

gdzie  $T_2$  jest czasem relaksacji poprzecznej nazywanym też czasem relaksacji spin-spin.



Rysunek 9 Zmiana poszczególnych składowych magnetyzacji w czasie oraz wykres  $M_y(M_x)$  dla  $T_1 = 600$  ms,  $T_2 = 100$  ms

### 5.4.6 Czasy korelacji

Z czasami relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  związany jest czas korelacji  $\tau_c$ , czyli czas, w którym cząsteczka zmieni swoje położenie o 1 radian (w płaszczyźnie) lub 1 steradian (w przestrzeni).

Wynika to z faktu, że ruch molekuł indukuje zmiany rozkładu pól lokalnych, co z kolei powoduje relaksację. Czas korelacji jest więc miarą ruchliwości molekuł - przy krótkim  $\tau_c$  molekuły poruszają się szybko (np. w cieczy), a przy długim - wolno (jak w ciele stałym).

Zależności czasów relaksacji od czasu korelacji dla pary różnych spinów opisują równania wyprowadzone na gruncie teorii Bloembergena-Purcella-Pounda (BPP) (Bloembergen i in. 1948):

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2}{r^6} \left( \frac{\tau_c}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} \right) \quad (92)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2}{r^6} \left( 4\tau_c + \frac{\tau_c}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_2^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} \right)$$

gdzie  $r$  - odległość pomiędzy oddziałującymi spinami. W przypadku pary jednakowych spinów  $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma$ ,  $\omega_1 = \omega_2 = \omega$  i powyższe wzory upraszczają się do postaci:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right),$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left( 3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right).$$
(93)

Jeśli przyjmie się, że czas korelacji jest opisany relacją Arrheniusa, tzn.

$$\tau_c = \tau_0 \exp \frac{E_a}{RT},$$
(94)

gdzie  $\tau_0$  jest czynnikiem przedeksponencjalnym,  $E_a$  - energią aktywacji rozumianą jako minimalna ilość energii potrzebnej do pokonania bariery energetycznej dla rozpoczęcia danego procesu ruchu (o danej częstotliwości), a  $R$  – stałą gazową, to zależność czasów  $T_1$  i  $T_2$  od odwrotności temperatury ma kształt przedstawiony na Rys. 10. Krzywa  $T_1(T^{-1})$  osiąga minimum dla  $\omega\tau_c = 0.616$ , gdzie  $\omega$  odpowiada częstotliwości pracy spektrometru.

Dla niskich temperatur (obszar po prawej stronie minimum) ruch obserwowanej molekuly jest wolniejszy od częstotliwości obserwacji  $\omega\tau_c > 0.616$ , a wzór BPP dla szybkości relaksacji podłużnej można w przybliżeniu zapisać jako:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \frac{2}{\omega^2 \tau_c}.$$
(95)

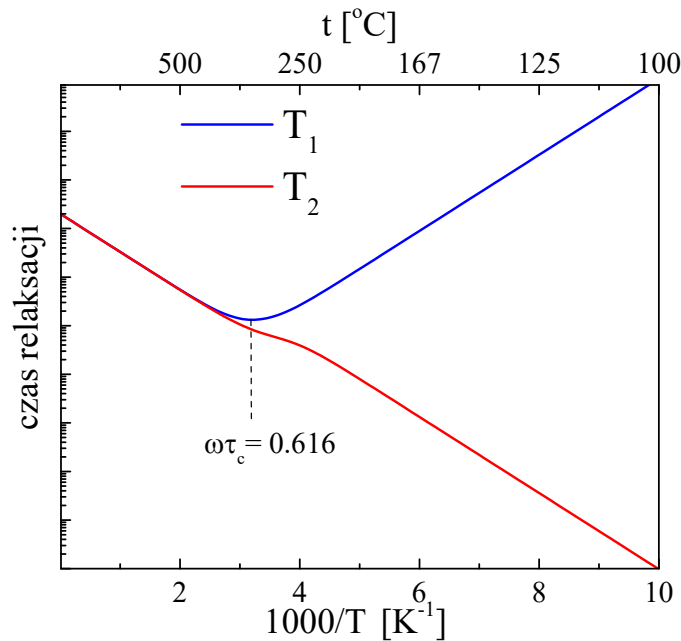
Z drugiej strony, dla wysokich temperatur, gdy  $\omega\tau_c < 0.616$ , ruch cząsteczek jest szybki, a szybkość relaksacji można przybliżyć wzorem

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} 5\tau_c.$$
(96)

W podobny sposób można przybliżyć szybkość relaksacji poprzecznej w wysokich i niskich temperaturach odpowiednio jako

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{3}{2} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \tau_c$$

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left( 3\tau_c + \frac{11}{2\omega^2 \tau_c} \right).$$
(97)



Rysunek 10 Schematycznie przedstawiona zależność czasów  $T_1$  i  $T_2$  od odwrotności temperatury

### 5.4.7 Transfer polaryzacji między jądrami $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

Na pograniczu między dwoma rezerwuarami jąder rezonansowych (tu: protonów) może dojść do zjawiska transferu (przeniesienia) magnetyzacji (polaryzacji). Ilekroć dwa protony z różnych faz znajdują się blisko siebie, oddziaływanie dipolowe umożliwia wymianę energii Zeemana między dwiema fazami. Efekt ten manifestuje się jako dwueksponencjalna relaksacja spin-sieć (Prantner i in. 2008).

W dalszych rozważaniach użyta zostanie tzw. zredukowana magnetyzacja zdefiniowana jako:

$$m_i(t) = -\frac{M_i(t) - M_{i\infty}}{2M_{i\infty}}, \quad (98)$$

gdzie  $M_i(t)$  oznacza magnetyzację podłużną  $i$ -tej puli protonów w chwili  $t$ , a  $M_{i\infty}$  - jej wartość równowagową. W układzie dwufazowym zmiana magnetyzacji  $i$ -tych protonów w czasie będzie wynikała z relaksacji podłużnej (o czasie  $T_{1i} = 1/R_{1i}$ ) oraz przeniesienia polaryzacji między dwoma pulami protonów:

$$\frac{dm_i}{dt} = -\left(R_{1i}m_i(t) - k_i m_i(t) + k_i m_j(t)\right), \quad (99)$$

gdzie stała  $k_i$  charakteryzuje prędkość przekazu polaryzacji z rezerwuaru  $i$  do rezerwuaru  $j$ . Rozwiązaniem jest funkcja dwueksponencjalna (Edzes i Samulski 1978)



$$m_i(t) = c_i^+ \exp(-R^+ t) + c_i^- \exp(-R^- t), \quad (100)$$

gdzie wprowadzono następujące wielkości:

$$2R^\pm = R_{1i} + R_{1j} + k_i + k_j \pm \sqrt{(R_{1i} - R_{1j} + k_i - k_j)^2 + 4k_i k_j}, \quad (101)$$

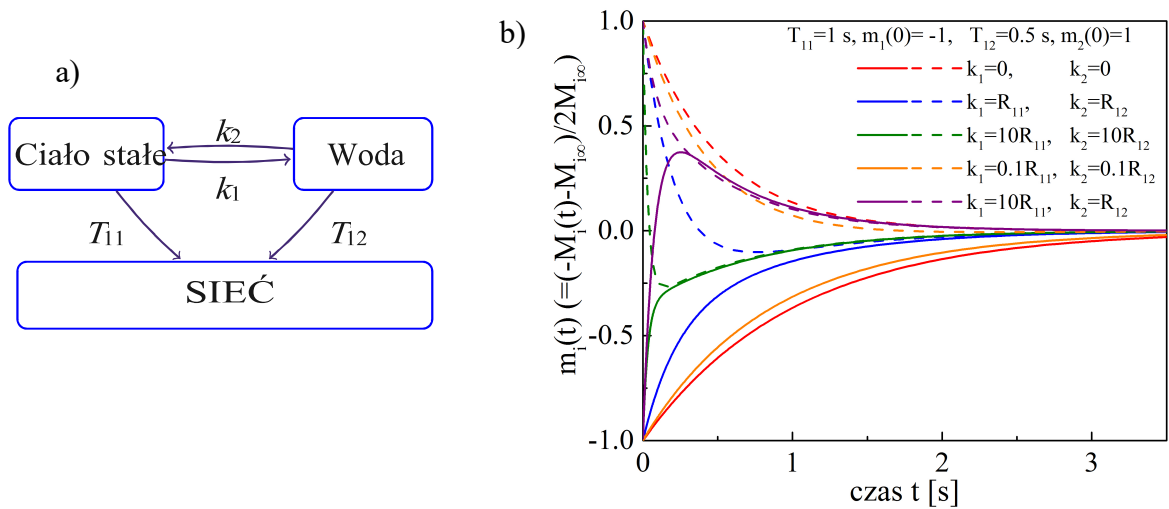
$$c_i^\pm = \pm m_i(0) \frac{R_{1i} - R^\mp}{R^+ - R^-} \pm (m_i(0) - m_j(0)) \frac{k_i}{R^+ - R^-}.$$

Szybkości transferu polaryzacji są bezpośrednio związane z zawartością protonów  $p$  w każdym z rezerwuarów:

$$p_i k_i = p_j k_j, \quad (102)$$

gdzie spełniona jest zależność

$$p_1 + p_2 = 1. \quad (103)$$

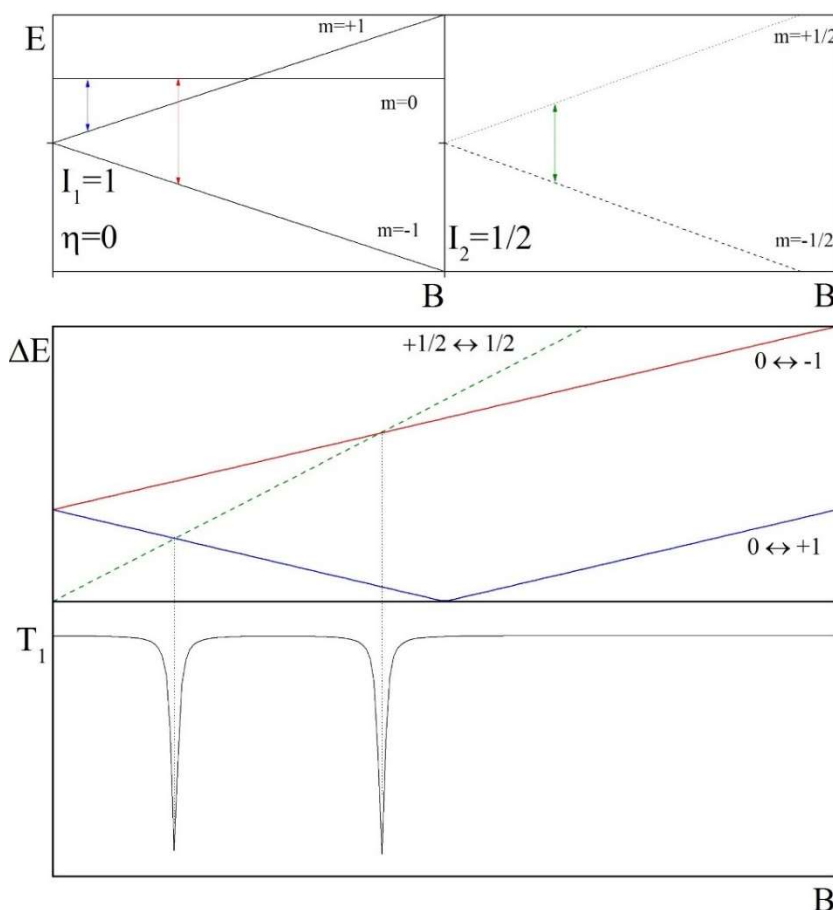


Rysunek 11 a) Model transferu magnetyzacji między dwoma rezerwuarami protonów: ciała stałego i wody, b) Zmiana zredukowanej magnetyzacji w czasie w zależności od szybkości transferu magnetyzacji (wyrażonej względem szybkości relaksacji podłużnej  $R_{1i}=1/T_{1i}$ ). Linie ciągłe – składowa 1, linie przerywane – składowa 2

### 5.4.8 Transfer polaryzacji między jądrami $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$

W układzie złożonym ze sprzężonych dipolowo jąderek o spinie  $S_1 = 1/2$  i  $I_2 > 1/2$ , jakie znajdują się w zewnętrznym polu magnetycznym  $B_0$ , możliwy jest transfer energii do jąderek kwadrupolowych, a następnie do sieci. Jądra takie mogą więc zapewnić dodatkowy mechanizm relaksacji jąderek o spinie półkwadowym.

Warunkiem do zajścia takiego zjawiska jest dopasowanie pola zewnętrznego tak, by zrównały się ze sobą energia przejścia zeemanowskiego jąderek  $I_1$  z energią przejścia między poziomami jąderek  $I_2$  (patrz równanie (82)). Przejawia się ono skróceniem efektywnego czasu relaksacji podłużnej i pojawieniem się minimów (tzw. dipów kwadrupolowych) na wykresie  $T_1(B)$  (patrz Rys. 12) (Falińska 2008; Nolte i in. 2002). Położenie tych minimów zależy bezpośrednio od właściwości jąderek kwadrupolowych: współczynnika asymetrii oraz stałej sprzężenia kwadrupolowego.



Rysunek 12 Schematycznie przedstawiony warunek na zajście transferu polaryzacji między jądrami  $^1\text{H}$  i  $^{14}\text{N}$  przy  $\eta = 0$  (na podstawie (Fujara i in. 1980))

## 5.5 Obserwacja zjawiska MRJ

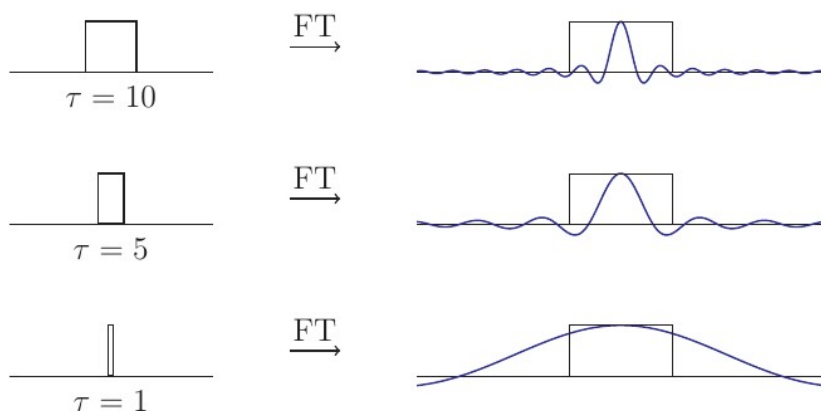
### 5.5.1 Wzbudzenie układu spinów i detekcja sygnału

By móc zaobserwować rezonansową absorpcję energii przez jądra atomowe należy, zgodnie ze wzorem (55), dostarczyć im energię  $\gamma\hbar B_0$ , dzięki której zmieni się orientacja momentu magnetycznego, a tym samym kierunek całej magnetyzacji. Rejestracja sygnału MRJ polega na obróceniu magnetyzacji na płaszczyznę, w której znajduje się cewka odbiorcza (zgodnie z dotychczasową konwencją będzie to płaszczyzna  $XY$ ). Obracająca się w płaszczyźnie detekcji magnetyzacja indukuje w cewce prąd, który jest rejestrowany przez układ detekcyjny.

W technice impulsowego MRJ stosuje się sekwencje impulsów o częstotliwości radiowej ( $rf$ ), jakie wzbudzają jądra, których częstotliwość rezonansowa mieści się w zakresie wyznaczonym przez transformatę Fouriera impulsu. W przypadku impulsu prostokątnego o czasie trwania  $\tau$  transformata taka ma postać funkcji *sincus*:

$$F(\omega) = FT(f(t)) \propto \frac{\sin \frac{\tau(\omega - \omega_{rf})}{2}}{\frac{\tau(\omega - \omega_{rf})}{2}}. \quad (104)$$

Funkcja ta ma maksimum w  $\omega - \omega_{rf} = 0$  i pierwsze miejsca zerowe w  $\omega - \omega_{rf} = \pm \frac{1}{2\tau}$ . Tylko jądra o częstotliwościach odpowiadających centrum rozkładu ulegną wzbudzeniu w sposób efektywny, stąd kluczowy jest odpowiedni dobór długości impulsu (patrz Rys. 13). Chcąc uzyskać równomierne wzbudzenie całej szerokości obserwowanego pasma należy skrócić  $\tau$ , jednak w niektórych przypadkach celowym jest użycie długiego czasu wzbudzenia tak, by zadziało tylko na jądra odpowiadające centralnym częstotliwościom (tzw. wzbudzenie selektywne).



Rysunek 13 Zależność kształtu profilu wzbudzenia od długości impulsu  $rf$

Od amplitudy (=pierwiastka mocy) oraz długości trwania impulsu zależy też kąt, o jaki obróci się magnetyzacja (patrz wzór (68)). Chcąc uzyskać sygnał o najlepszym stosunku S/N dobiera się te parametry tak, by wektor magnetyzacji odwrócił się o  $90^\circ$ , a więc by składowa poprzeczna magnetyzacji miała wartość maksymalną (tzw. impuls  $\pi/2$ ).

W wyniku zjawiska relaksacji wektor magnetyzacji powraca do stanu równowagi, jego składowa  $M_{xy}$  ulega zmniejszeniu, a indukowana w cewce siła elektromotoryczna maleje. Sygnał ten, zawierający informację rezonansową, nazywany jest sygnałem swobodnej precesji (FID). Jego amplituda jest proporcjonalna do gęstości jąder rezonansowych w próbce. W jednorodnym polu zanikałby on z czasem  $T_2$ , ale wskutek niejednorodności pola magnetyzacje w różnych obszarach próbki precesują z różną częstotliwością (tzw. zjawisko rozwinięcia w wachlarz). Przez to FID zanika szybciej, ze stałą czasową  $T_2^*$  nazywaną efektywnym czasem relaksacji poprzecznej, powiązaną z czasem relaksacji  $T_2$  relacją:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2}, \quad (105)$$

gdzie czynnik  $\Delta B_0$  jest miarą niejednorodności pola.

### 5.5.2 Kształt linii rezonansowych w domenie częstotliwości

Sygnał FID zawiera informacje rezonansowe w postaci funkcji napięcia od czasu  $V = f(t)$ . Aby uzyskać bardziej użyteczne informacje rezonansowe konieczne jest poddanie tegoż sygnału transformacji Fouriera, w wyniku której uzyskuje się sygnał MRJ w postaci zależności napięcia od częstotliwości:

$$F(\omega) = FT(f(t)) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-2\pi i \omega t} dt. \quad (106)$$

Efektem jest krzywa rezonansowa o maksimum w częstotliwości Larmore'a  $\omega_0$ . Ze względów praktycznych w dalszej części pracy poświęconej spektroskopii MRJ zamiast częstotliwości będzie używana częstotliwość  $f = 2\pi\omega$ .

W próbce w stanie ciekłym przyczynki od oddziaływania dipolowego oraz anizotropii przesunięcia chemicznego, a więc i wartości pól lokalnych, są uśredniane w wyniku ruchów cząsteczkowych cieczy, co skutkuje wąską, lorentzowską linią rezonansową:

$$L(f) = \frac{2A^L}{\pi} \frac{f_{1/2}}{4(f - f_0)^2 + f_{1/2}^2}, \quad (107)$$

gdzie  $A^L$  jest polem pod linią (proporcjonalnym do liczby jąder rezonansowych),  $f_{1/2}$  - szerokością połówkową linii, a  $f_0$  - położeniem maksimum linii.

W przypadku ciała stałego, gdy molekuly ruszają się znacznie wolniej niż w cieczy, pola lokalne nie ulegają uśrednieniu i wzbudzenie występuje w szerszym zakresie częstotliwości. Można rozważyć szczególny przypadek linii rezonansowej monokryształu zawierającego odizolowane pary jąder. Z postaci funkcji (73) wynika, że widmo będzie się składać z dwóch linii rozdzielonych na odległość rzędu  $D$  (stała sprzężenia dipolowego, patrz równanie (74)), zależną od orientacji kryształu względem pola zewnętrznego. Jeśli jednak mamy do czynienia z próbką proszkową, czyli gdy dozwolone są wszystkie wartości kąta  $\theta$ , to widoczny jest tzw. dublet Pake'a (Pake 1948), czyli superpozycja wszystkich linii położonych w zakresie dozwolonym przez wartości wyrażenia  $(1 - 3\cos^2\theta)$ . Widmo przedstawiające dublet Pake'a jest opisane funkcją

$$\begin{aligned} P(f) &= P_1(f) + P_2(f) \\ P_1(f) &= \frac{1}{\sqrt{a+f}}, \quad f \in (-a, 2a) \\ P_1(f) &= 0, \quad f \notin (-a, 2a) \\ P_2(f) &= \frac{1}{\sqrt{a-f}}, \quad f \in (-2a, a) \\ P_2(f) &= 0, \quad f \notin (-2a, a). \end{aligned} \quad (108)$$

Maksima w takim dublecie są rozszczepione na odległość  $D$  w przypadku heteronuklearnym lub na odległość  $\frac{3}{2}D$  w przypadku homonuklearnym. W praktyce, wskutek oddziaływań z innymi jądrami, obserwuje się poszerzone dublety Pake'a, modelowane przez spłot funkcji (108) z funkcją Gaussa

$$P_{br}(f) = G(f) * P(f). \quad (109)$$

W przypadku wielu próbek krystalicznych lub w fazie szklistej sygnał FID pochodzący od matrycy stałej najlepiej opisuje tzw. funkcja Abragama (Abragam 1961) będąca w domenie czasu iloczynem funkcji Gaussa i sincus:

$$A(t) = A_0 \exp\left(-\frac{a^2 t^2}{2}\right) \frac{\sin bt}{bt}. \quad (110)$$

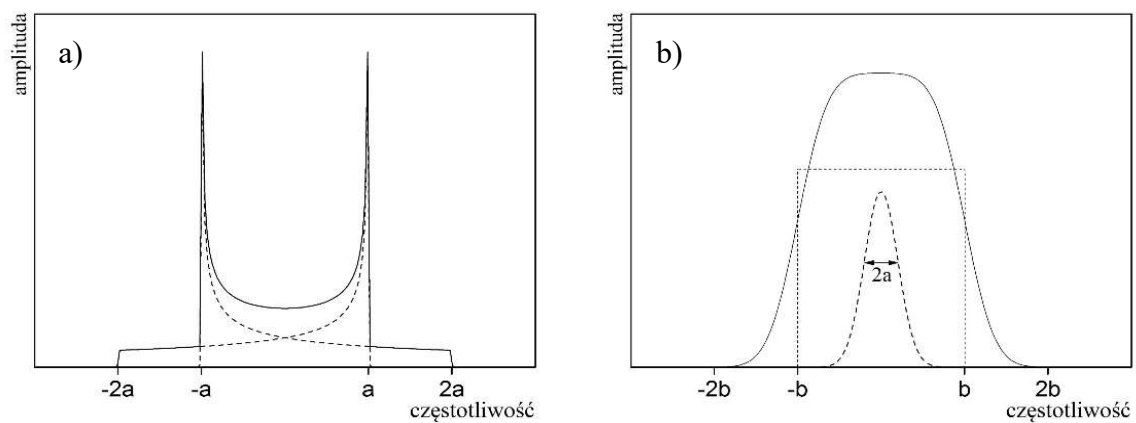
Transformata Fouriera z funkcji Abragama jest splotem funkcji schodkowej o szerokości  $2b$  z funkcją Gaussa o wariancji  $\sigma$  równej  $2a$  ( $f_{1/2} = \frac{\sqrt{2 \ln 2} \sigma}{\pi}$ ) (Cowan 2005):

$$\begin{aligned} FT(A(t)) &= FT\left(A_0 \exp\left(-\frac{a^2 t^2}{2}\right) \frac{\sin bt}{bt}\right) \\ &= A_0 FT\left(\exp\left(-\frac{a^2 t^2}{2}\right)\right) * FT\left(\frac{\sin bt}{bt}\right) = A_0 G(f) * \Pi_{-b,b}. \end{aligned} \quad (111)$$

Funkcja Abragama była z powodzeniem używana do opisu sygnału MRJ w domenie czasu dla wielu układów biologicznych (Harańczyk i Kobierski 2012; Harańczyk, Pater, i in. 2012; Harańczyk i in. 2008; Melian-Flamand 2009). Najczęściej jednak do opisu linii pochodzącej od protonów ciała stałego wystarcza funkcja Gaussa:

$$G(f) = \frac{A^G \sqrt{\ln 4}}{f_{1/2} \sqrt{\pi/2}} e^{-\frac{2(f-f_0)^2 \ln 4}{f_{1/2}^2}}, \quad (112)$$

gdzie oznaczenia są analogiczne, jak w przypadku funkcji Lorentza zdefiniowanej równaniem (107) (Harańczyk 2003; Derbyshire i in. 2004). Szerokość linii zależy od oddziaływań, jakim podlegają obserwowane jądra rezonansowe; wszystkie oddziaływania będące mechanizmami relaksacji mogą powodować dalsze poszerzenie linii. W przypadku jąder atomowych o spinie  $1/2$  (w tym w wodrze  $^1\text{H}$ ) zasadniczy wpływ na szerokość linii mają oddziaływania dipolowe.



Rysunek 14 Kształty linii opisujące sygnał od protonów ciała stałego: dublet Pake'a (a) oraz funkcja Abrahama (b)

# 6 Materiały i metody

## 6.1 Preparatyka pokryw chrząszczy

### 6.1.1 Przedmiot badań

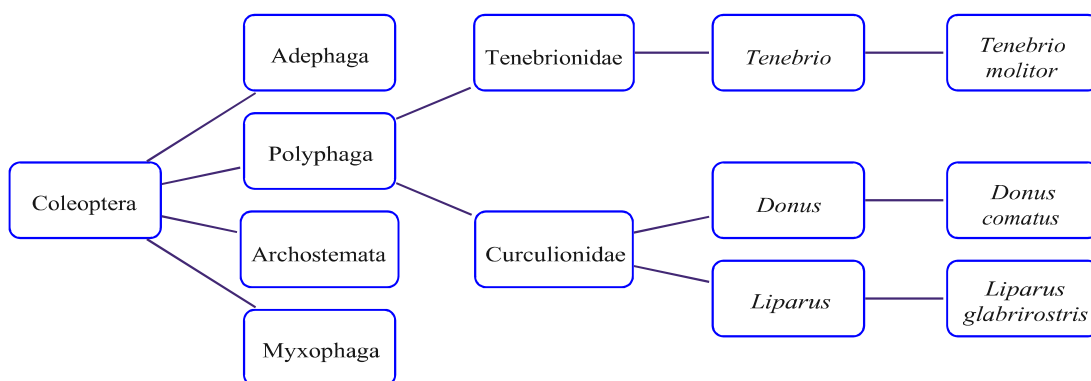
Badania przeprowadzono na pokrywach trzech gatunków z podrzędu chrząszczy wielożernych (Coleoptera: Coleoptera-Polyphaga), w tym dwóch z rodziny ryjkowcowatych (Curculionidae) oraz jednego z czarnuchowatych (Tenebrionidae).

#### Curculionidae

*Donus comatus* (Boheman in Schonherr, 1842) jest gatunkiem górskim zasiedlającym Alpy południowo-wschodnie, Sudety oraz Karpaty, po północnozachodnie obszary Półwyspu Bałkańskiego. W Polsce występuje na obszarach Karpat i Sudetów, aż po piętro alpejskie. Występuje głównie w miejscach wilgotnych i cienistych, zwłaszcza na pobrzeżach cieków wodnych (Burakowski i in. 2000; Knutelski 2005). Żyje na różnych roślinach zielnych. Gatunek ten jest bardzo zmienny indywidualnie i geograficznie. Pokrywy *D. comatus* są regularnie owalne, na końcu nieco zaokrąglone, ich końce słabo rozchylone lub nie rozchylone w ogóle (Smreczyński 1968). Ryjkowiec ten nie lata (Knutelski 2005).

*Liparus glabrirostris* (Kuster, 1849b), rozpucznik, jest największym gatunkiem ryjkowców w Europie. Swoim zasięgiem obejmuje głównie obszary górskie i podgórskie środkowej części Europy, od Pirenejów i północnych Włoch po Siedmiogród. W Polsce zasiedla głównie obszary wyżynne i górskie, w tym okolice Ojcowa oraz wyspowe stanowiska niżowe na pojezierzach (Sikora i in. 2015). Występuje przeważnie w zaroślach przypotokowych z udziałem lepiężników (*Petasites*) w chłodnych i cienistych siedliskach dolin rzecznych i potoków (Burakowski i in. 2000; Knutelski 2005). Podobnie jak poprzedni gatunek, nie lata i ma pokrywy owalne, gładkie, a ich podstawa jest nieco szersza od nasady przedplecza, prosta lub łukowato wycięta (Smreczyński 1968).





Rysunek 15 Skrócone drzewo filogenetyczne badanych gatunków chrząszczy

## Tenebrionidae

*Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), mącznik młynarek, jest gatunkiem kosmopolitycznym. Zasiada całą Europę, przy czym w północnej części zasięgu jest synantropijny (żyje w środowiskach antropogenicznych), żeruje na zapasach mąki, otrębów, chleba i innych przetworów zbożowych. Czasem spotykany jest także w siedliskach naturalnych, przeważnie w murszu i pod odstającą korą starych drzew liściastych, gdzie postaci dojrzałe i larwy odżywiają się zmurszałym, przegrzybiałym drewnem, mączką drzewną powstałą z żeru larw różnych owadów drewnożernych i próchnożernych oraz ich ekskrementami i martwymi osobnikami (Burakowski i in. 2000).

Pokrywy tego gatunku są długie, z wyraźnymi rzędami wgłębień tworzących punktowane linie. Rzędy te są mniej lub bardziej sklepione z bardzo drobnymi zmarszczkami i gęsto rozmieszczonymi punktami (Stebnicka 1991).

### 6.1.2 Preparatyka

Oba gatunki ryjkowców zostały zebrane w warunkach naturalnych Karpat, a *T. monitor* wyhodowano w Zakładzie Entomologii UJ. Po uśpieniu osobników pokrywy zostały oddzielane od reszty ciała i izolowane w specjalnych, szklanych pojemnikach na sucho do dalszych analiz.

## 6.2 Skaningowa mikroskopia elektronowa

Do badań przeznaczonych metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wysuszone pokrywy najpierw przełamano wzdłuż, w poprzek i na ukos za pomocą pęsety,

żeby otrzymać jak najwięcej możliwości obserwacji. Następnie przyklejono je do podłoża tak, żeby dana pokrywa była widoczna od strony zewnętrznej (grzbietowej), wewnętrznej (brzuszej) oraz na przekroju poprzecznym, podłużnym i skośnym. Tak przygotowane na holderach materiały były napyłane węglem i złotem, po czym zostały umieszczone w mikroskopie skaningowym firmy JEOL 100 SX w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Transmisyjnej Zakładu Biologii i Obrazowania Komórki w Instytucie Zoologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ. W dalszym etapie obserwowano pokrywy, stosując różne powiększenia i wykonywano zdjęcia.

Mikrogramy zostały zanalizowane przy pomocy programu ImageJ (Abramoff i in. 2004).

### 6.3 Badanie kinetyki hydratacji

W badaniach kinetyki hydratacji uwadniano z fazy gazowej próbki pokryw umieszczone w eksykatorach zawierających substancje, zmieniające ciśnienie pary wodnej nad ich powierzchnią. Wykorzystano roztwory niektórych soli oraz kwas fosforowy (Tab. 1). Za wybrany sposób uwadniania przemawia łatwość wytworzenia i utrzymania atmosfery o żądanej wilgotności, niska cena używanych roztworów oraz niewielka wrażliwość na zmiany temperatury. Problemem mogło być jedynie utrzymanie wysokiej czystości tych substancji, gdyż już niewielki poziom zanieczyszczeń mógł spowodować zmianę wilgotności (Barbosa-Cánovas i in. 2008).

Przyrosty masy określano poprzez ważenie próbek na wadze elektronicznej o dokładności  $10^{-5}$  g (*RadWag*) umieszczonej na podłożu antywibracyjnym. Uwodnienie wyrażano w jednostkach suchej masy próbki,  $m_0$ :

$$\Delta m(t) = \frac{m(t) - m_0}{m_0}. \quad (113)$$

Tabela 1 Substancje użyte do hydratacji z fazy gazowej

$p/p_0$	skład	$p/p_0$	skład

0%	żel krzemionkowy	63%	$NH_4NO_3$
9%	$H_3PO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$	76%	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
23%	$KC_2H_3O_2$	88%	$K_2CO_3$
32%	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	93%	$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$
44%	$K_2CO_3$	97%	$K_2SO_4$
52%	$Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$	100%	$H_2O$

Suchą masę  $m_0$  wyznaczano po kilkudniowym wyprażaniu pokryw w 343 K, przeprowadzanym na końcu serii pomiarów. Uwodnienia próbek powietrznie suchych oraz suche masy próbek użytych w pomiarach zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2 Masy próbek użytych do pomiarów spektroskopii  $^1H$ -NMR

gatunek	uwodnienie próbki powietrznie suchej, $m_{ps}$ [ $\Delta m/m_0$ ]	sucha masa $m_0$ [g]
<i>L. glabrirostris</i>	0.066	3446
<i>D. comatus</i>	0.081	2136
<i>T. molitor</i>	0.045	2217

## 6.4 Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego

### 6.4.1 Spektroskopia $^1H$ MRJ

#### 6.4.1.1. Aparatura

Badania MRJ w domenie częstotliwości wykonywane były na spektrometrze Bruker Avance III 300 z serii Bruker Biospin, wyposażonym w: magnes nadprzewodzący o średnicy otworu 89 mm (tzw. zestaw *wide-bore*), wytwarzający pole magnetyczne o indukcji 7 T (co odpowiada częstotliwości rezonansowej  $^1H$  300 MHz), głowice pomiarowe wysokiej mocy, stabilizator temperatury oraz komputer. Magnes nadprzewodzący umieszczony jest w ciekłym helu oraz otoczony płaszczem izolującym,

zawierającym ciekły azot. Urządzenie można podzielić na cztery części: blok sterowania akwizycją, przedwzmacniacz wysokiej wydajności, system wzmacniaczy oraz blok kontroli magnezu.

Blok sterowania akwizycją składa się z części generującej impulsy  $RF$  wykorzystywane do rezonansowego wzbudzenia próbek oraz z części odbierającej sygnał. W systemie wzmacniaczy następuje wzmocnienie generowanych w bloku sterowania akwizycją sygnałów. Przedwzmacniacz wzmacnia, a następnie filtruje sygnał wygenerowany przez wzbudzoną uprzednio próbkę. Wzmacnia także i filtruje impuls wychodzący z wzmacniaczy, który transmituje dalej do cewki nadawczo-odbiorczej. System sterowania magnezu kontroluje wartość pola magnetycznego  $B_0$ , odpowiada za jego stabilizację oraz kompensuje niejednorodności.

Czas martwy spektrometru wynosił  $6.5 \mu s$ . Moc najczęściej stosowanego, „twardego” impulsu wynosiła 400 W. Do ochładzania próbki dla pomiarów w funkcji temperatury wykorzystano strumień par azotu gazowego odparowywanego z ciekłego azotu. Sterownik temperatury *Eurotherm* umożliwiał odczyt temperatury w miejscu czujnika z dokładnością do 0.1 K; wahania temperatury w trakcie pomiaru nie przekraczały 0.2 K. Wszystkie pomiary hydratacyjne przeprowadzono w temperaturze 293 K.

#### **6.4.1.2. Przygotowanie materiału**

Jedynie pokrywy *T. molitor* mieściły się w całości w probówce NMR o średnicy 5 mm. Pokrywy *D. comatus* i *L. glabrirostris* musiano przełamać aby przeprowadzić pomiary. Zostały one przełamane wzdłuż na dwie lub więcej w części – w przypadku *L. glabrirostris*. Uwadnianie materiału zachodziło w otwartych probówkach w eksykatorze o wilgotności względnej 100% (patrz Tab. 1). W trakcie pomiaru próbki były zaklejone parafilmem w celu zminimalizowania efektu wysychania.

#### **6.4.1.3. Sekwencje pomiarowe**

**Impuls  $\pi/2$**  Widma NMR w funkcji uwodnienia otrzymano dzięki rejestracji FIDu po pojedynczym impulsie  $\pi/2$ . Czas trwania impulsu dla danej próbki wyznaczono poprzez znalezienie maksimum zależności amplitudy sygnału od czasu trwania impulsu dla serii pomiarów o mocy impulsu równej 400 W. Wyniósł on  $1.5 \mu s$  dla pokryw *L. glabrirostris*

i 2.1  $\mu\text{s}$  dla pokryw *T. molitor* i *D. comatus*. Czas repetycji (RT) wynosił 5 s, pojedynczy pomiar był średnią 16 (w przypadku pomiarów z użyciem ciekłego azotu) lub 32 akumulacji.

**Sekwencja Carra-Purcella-Meibooma-Gilla** Zanik sygnału swobodnej precesji daje nam bezpośrednią informację nt. efektywnego czasu relaksacji poprzecznej, tj. czasu  $T_2^*$ . Do wyznaczenia faktycznej wartości czasu  $T_2$ , bez wpływu niejednorodności pola na sygnał, użyto sekwencji Carra-Purcella-Meibooma-Gilla (CPMG). Składa się ona z impulsu  $\pi/2$  oraz serii  $c$  impulsów  $\pi$  co czas  $2\tau$ . Zwiększając ilość cykli zwiększa się czas ewolucji układu zgodnie ze wzorem

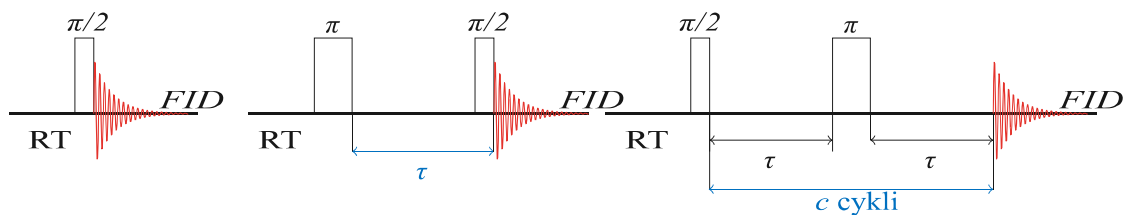
$$t = (2\tau + t_\pi)c \quad (114)$$

gdzie  $t_\pi$  jest czasem trwania impulsu  $\pi$ . Zmniejszanie amplitudy generowanych ech odpowiadające zmniejszaniu się składowej poprzecznej magnetyzacji jest opisane funkcją eksponencjalną z czasem zaniku  $T_2$  (patrz równanie (88)).

**Sekwencja zaniku inwersji** Sekwencja zaniku inwersji (ang. *Inversion Recovery*, IR) służy do pomiaru czasu relaksacji  $T_1$ . Polega na potraktowaniu jąder kolejno impulsami  $\pi$  i  $\pi/2$ . Pierwszy z nich odwraca magnetyzację do wartości  $-M_\infty$ , drugi zaś obraca magnetyzację na płaszczyznę detekcji,  $xy$ .

Między impulsami zachodzi relaksacja podłużna. Wartość składowej  $M_z$  rejestrowanej poprzez pomiar FID po impulsie  $\pi/2$  będzie zależeć od tego jak długo układ będzie mógł swobodnie relaksować (zgodnie z równaniem (88)), a więc będzie zależeć od odstępu czasu  $\tau$ .

Czasy  $\tau$  dobierano logarytmicznie w zależności od estymowanej wartości  $T_1$  tak, by najdłuższa jego wartość wynosiła ok.  $4T_1$ , czas repetycji ustalano na około  $5T_1$ . Seria widm była uśrednionym wynikiem 16 (w przypadku pomiarów z użyciem ciekłego azotu) lub 32 akumulacji.



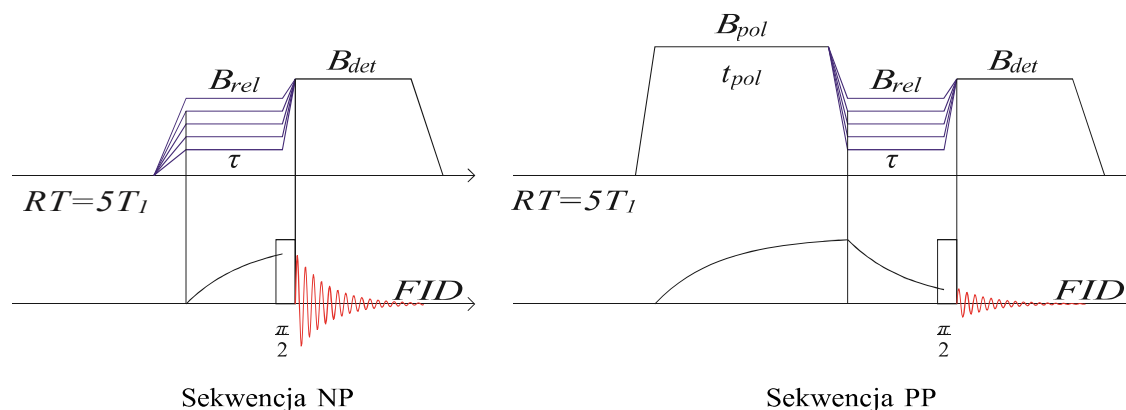
Rysunek 16 Sekwencje pomiarowe użyte w spektroskopii  $^1\text{H-NMR}$ : impuls  $\pi/2$ , sekwencja zaniku inwersji oraz sekwencja CPMG. Na niebiesko zaznaczono parametr zmieniany w czasie pomiaru

**Sekwencja selektywnego wzbudzenia** Sekwencja selektywnego wzbudzenia, zwana potocznie sekwencją „*soft-hard*”, jest modyfikacją sekwencji zaniku inwersji, jaka wykorzystuje dwa rodzaje impulsów: twarde (o dużej mocy, tu  $P_H = 400$  W) oraz miękkie (impulsy o małej mocy). By uzyskać efekt odwrócenia magnetyzacji za pomocą miękkiego impulsu, należy działać nim na jądra odpowiednio dłużej (patrz równanie (68)). Jak opisano to w podrozdziale 5.5.1, impuls „miękki” obraca tylko mobilne protony pochodzące od cieczy. Doboru parametrów takiego impulsu dla każdej próbki dokonano po zmierzeniu serii widm w funkcji mocy dla ustalonego, długiego czasu  $t_{rf}$ , jaki selektywnie wzbudzał tylko protony cieczowe. Ostatecznie dla pokryw *D. comatus* dobrano następujące parametry miękkiego impulsu:  $P_S = 0.15$  W i  $t_{\pi/2} = 300$   $\mu$ s.

## 6.4.2 Relaksometria FC-NMR

### 6.4.2.1. Aparatura

Pomiary FC-NMR (ang. *Field Cycling* - zmiennego pola magnetycznego) przeprowadzono na relaksometrze SpinMaster 2000T firmy Stelar. Umożliwia on wykonywanie pomiarów w funkcji pola  $B_0$ , w którym to polu przebiega relaksacja próbki (oznaczanego dalej jako  $B_{rel}$ ). Pomiar całego profilu dyspersyjnego w zakresie 0.23-587 mT (co odpowiada zakresowi częstotliwości larmorowskich dla protonów 0.01-25 MHz) jest podzielony na dwa etapy. Dla wysokich pól  $B_0$  ( $> 283$  mT) próbka ulega polaryzacji, a następnie relaksuje w tym samym polu  $B_{rel}$  (sekwencja *non-polarized*, NP). Dla niższych pól konieczne jest wprowadzenie wcześniejszej polaryzacji przez czas  $t_{pol}$  w polu  $B_{pol}$ , następnie próbka relaksuje w polu  $B_{rel}$  (sekwencja *pre-polarized*, PP). W obu przypadkach detekcji dokonuje się w polu  $B_{det} = 423$  mT. Zmiana pola odbywa się z szybkością 282 T/s, przez co najkrótsze rejestrowalne czasy  $T_1$  są równe ok. 2-3 ms.



Rysunek 17 Pola używane podczas pomiaru metodą FC-NMR

#### 6.4.2.2. Przygotowanie materiału do pomiarów FC-NMR

Wszystkie badane pokrywy zmieściły się w całości do próbówki NMR o średnicy 1 cm. Pomiaru zostały przeprowadzone dla materiału powietrznie suchego, a więc dla poziomu uwodnienia równego  $\Delta m/m_0 = 0.045, 0.066, 0.081$  odpowiednio dla *T. molitor*, *L. glabrirostris* i *D. comatus*. By zapewnić stały poziom uwodnienia próbki, na czas pomiaru próbówki były dodatkowo zabezpieczone parafilmem.

#### 6.4.2.3. Sekwencja pomiarowa

Do wyznaczenia czasów relaksacji podłużnej został użyty pojedynczy impuls  $\pi/2$ , którym działano w różnych odstępach czasu od rozpoczęcia relaksacji w polu  $B_{rel}$ . Amplituda rejestrowanych FIDów w funkcji czasu  $\tau$  pozwoliła na wyznaczenie czasu  $T_1$  zgodnie z równaniem (88) (patrz Rys. 17). Czas repetycji  $RT$  dla wszystkich pomiarów wynosił pięciokrotność czasu relaksacji podłużnej w najwyższym polu (czyli w 587 mT). Wartość magnetyzacji w każdym punkcie jest efektem uśrednienia 128 pomiarów. W sekwencji PP polaryzowano próbkę w polu 470 mT.

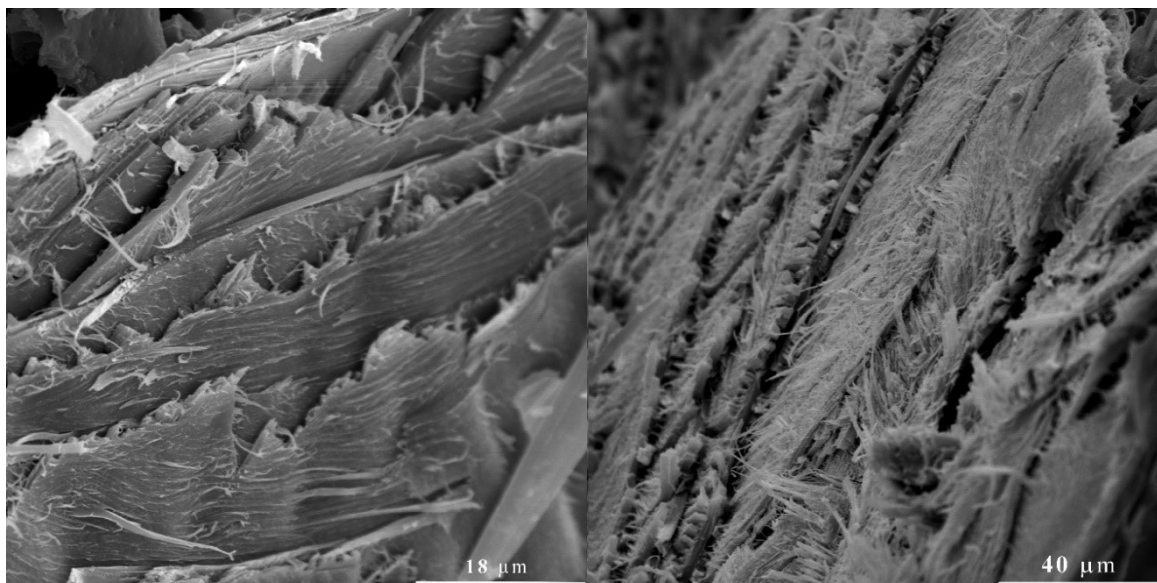
# 7 Wyniki

## 7.1 Mikrogramy SEM

W przypadku wszystkich badanych gatunków mikrografia elektronowa wykazała istnienie struktury typu „sklejki o skręconych warstwach” w obrębie pokryw. Ponadto udało się wyróżnić w strukturze pokrywy różnego rodzaju pory, szczeliny oraz mikrowłósciki o bliżej nieznanym celu. W szczególności budowa ta u poszczególnych gatunków przedstawia się następująco.

### *Donus comatus*

W zależności od miejsca przełomu pokrywa *D. comatus* jest zbudowana z 10-30 skręconych względem siebie warstw. Ich średnia grubość wynosi  $1.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (odczytu dokonano z kilku niezależnych ujęć, dla różnych warstw).



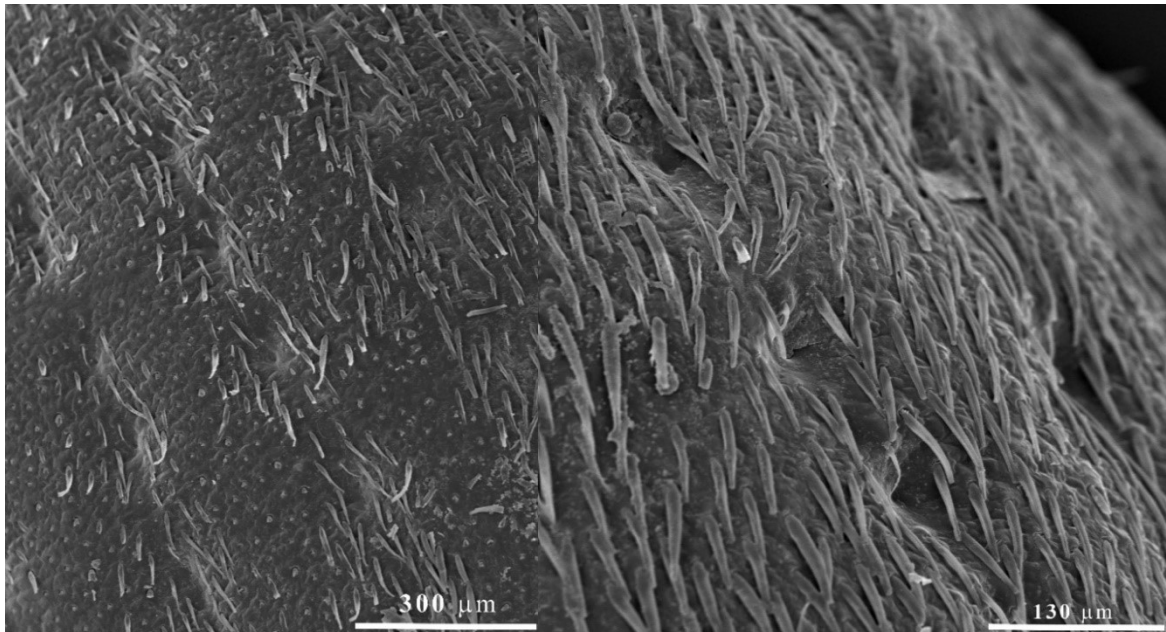
Rysunek 18 Przekroje poprzeczne przez pokrywy *D. comatus*

Strona grzbietowa pokrywy jest pokryta mikrołuskami zgrupowanymi w rzędy zorientowane od strony głowy do odwłoka. Wzdłuż zaobserwowanych rzędów znajdują się wgłębienia ze szczelinami odpowiadającymi wpukleniom po stronie brzusznej pokrywy. Średnie odległości między rzędami wgłębień wynoszą ok. 280 μm. Część łusek wygląda inaczej – są krótsze i tępo zakończone, zamiast stopniowo zwężać się ku końcowi

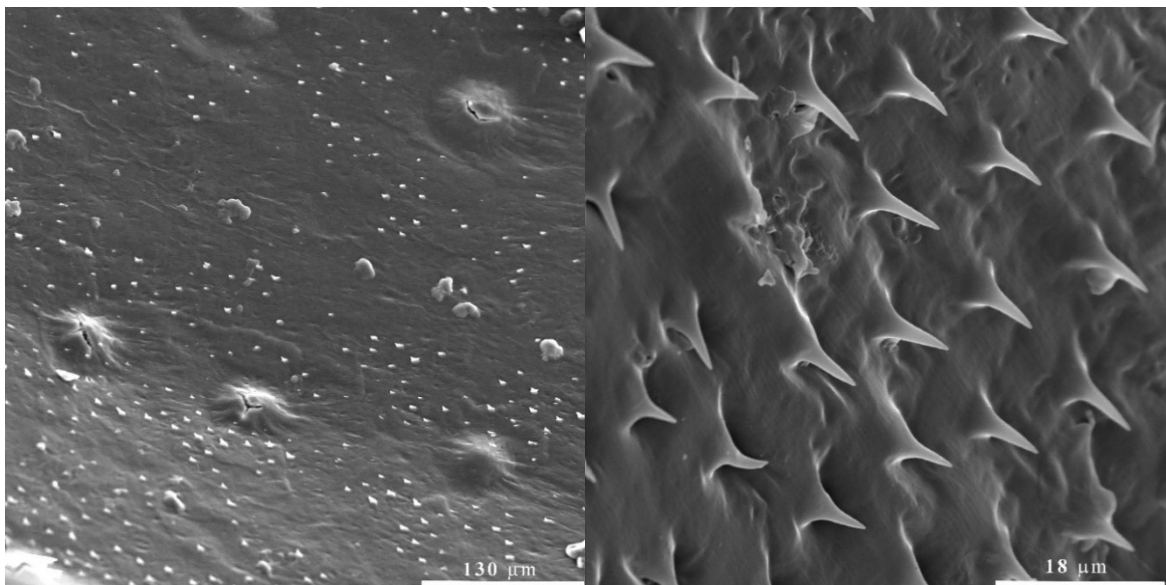


(patrz Rys. 19) i sprawiają wrażenie, jakby zostały uszkodzone w trakcie życia owada. Długość łusek „nieuszkodzonych” wynosi ok.  $(62 \pm 7) \mu\text{m}$ , zaś szerokość: ok.  $6 \mu\text{m}$ .

Strona brzuszna pokrywy nie jest jednorodna, lecz pokryta nierównomiernymi skupiskami wytworów w kształcie kolców o długości ok.  $7.5 \mu\text{m}$ . Na powierzchni brzusznej zaobserwowano rzędy, już wspomnianych, wpukleń z pęknięciami na szczycie (Rys. 20).



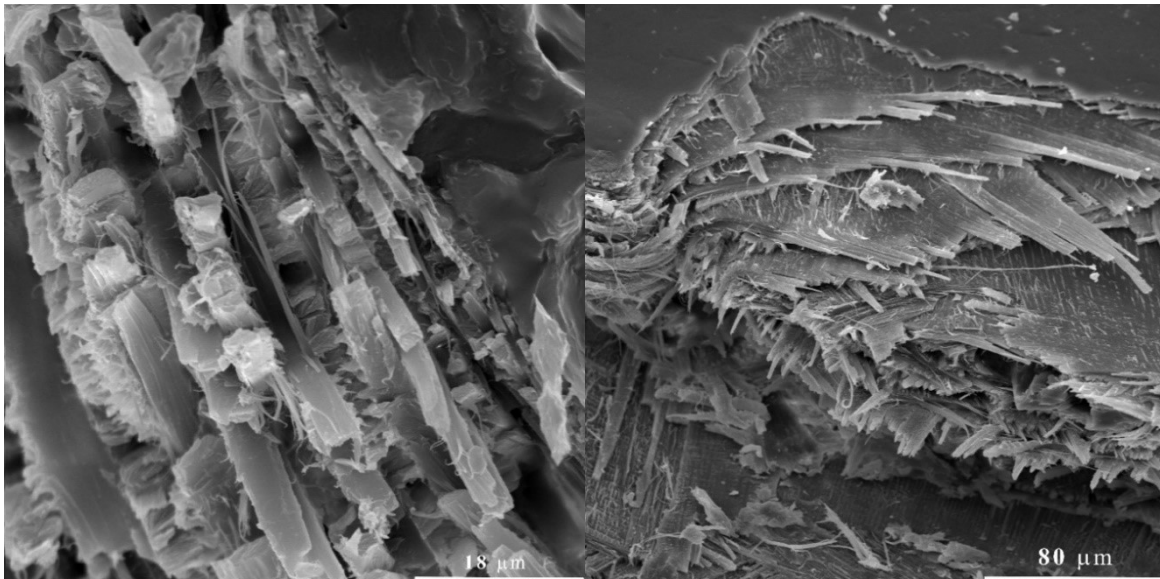
Rysunek 19 Strona grzbietowa pokryw *D. comatus*



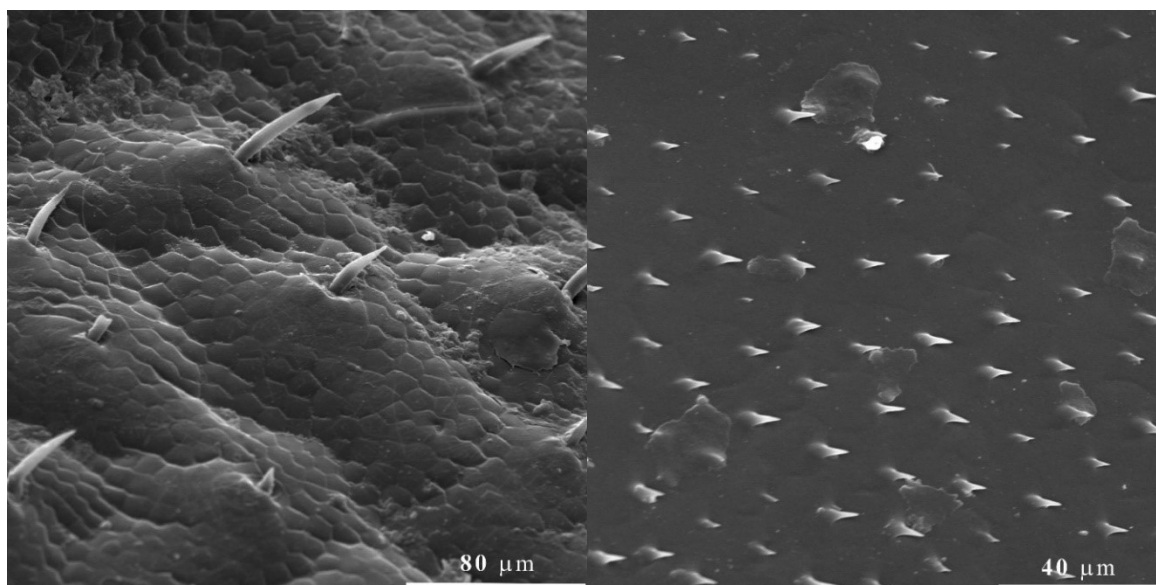
Rysunek 20 Strona brzuszna pokryw *D. comatus*

### *Liparus glabrirostris*

Powierzchnia grzbietowa pokryw rozpuszcza lepężnikowca *L. glabrirostris* ma złożoną fakturę. Jest pokryta regularnymi nierównościami, ze szczytu których wyrastają kolcowate wytwory, zaś w większym powiększeniu uwidaczniają się na niej sześciokątne kafelki z wgłębieniem w środku (Rys. 22). Strona brzuszna pokryw jest regularnie pokryta stożkowatymi kolcami (o długości ok. 10  $\mu\text{m}$  i o średnicy podstawy ok. 5  $\mu\text{m}$ ). Przekroje poprzeczne uwidaczniają strukturę helikalnie skręconej sklejki. Grubość pojedynczych warstw sklejki zmienia się od ok. 0.75 do 5.5  $\mu\text{m}$ , a kierunek mikrowłókien w kolejnych warstwach zmienia się o 10-25° (patrz Rys. 21). Zmiana ta ma charakter przypadkowy, tzn. nie zaobserwowano stopniowego wzrostu kąta.



Rysunek 21 Przekroje poprzeczne przez pokrywę *L. glabrirostris*



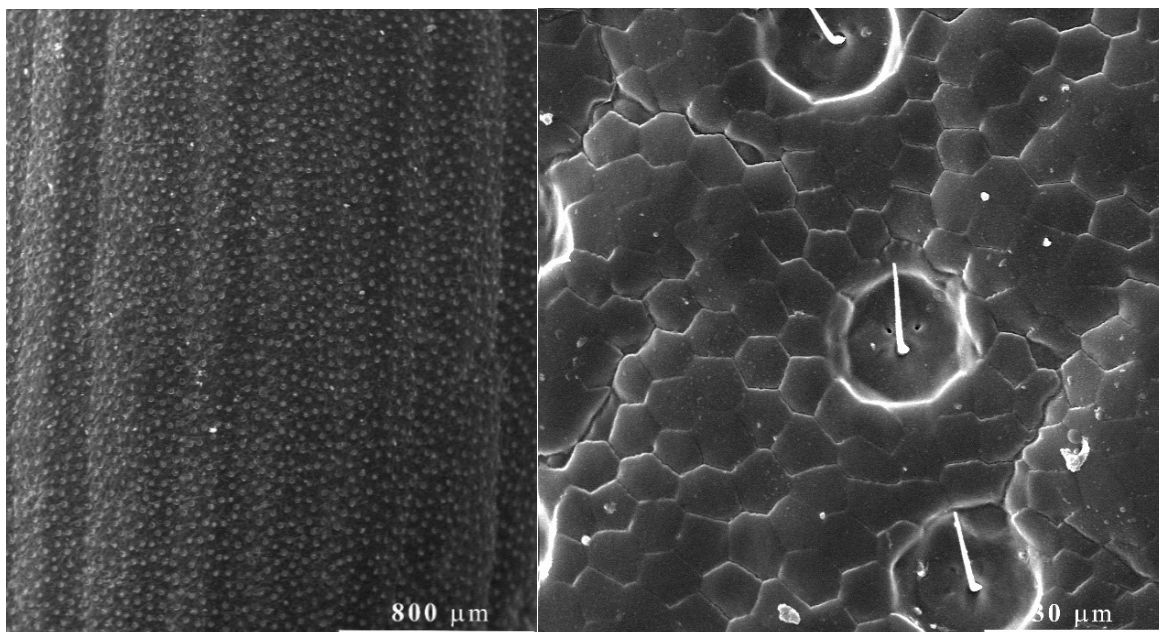
Rysunek 22 Strona grzbietowa (z lewej) i brzuszna (z prawej) pokrywy *L. glabrirostris*

### ***Tenebrio molitor***

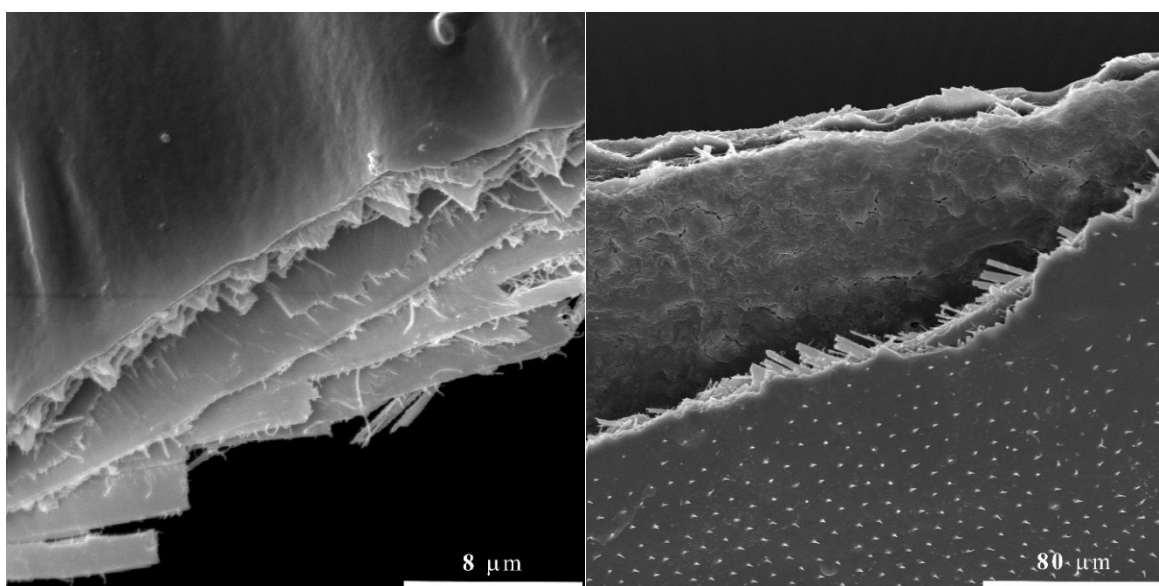
Pokrywy mącznika młynarka, *T. molitor*, są wyraźnie podłużnie żeberkowane. Powierzchnia grzbietowa jest zbudowana z regularnych segmentów o kształcie sześciokątów o boku 3.5-5 μm. Dodatkowo, powierzchnię pokrywają gęsto, lecz nieregularnie rozmieszczone okrągłe wgłębienia z włosowatymi wytworami w środku (patrz Rys. 23).

Strona brzuszna pokrywy jest w większości pokryta kolcowatymi mikrowłóskami (podobnymi do opisanych u *D. comatus*). W centralnej części pokrywy znajduje się wrzecionowate skupisko bardzo regularnych spłaszczonych kolców o długości ok. 10 μm, które stanowią mechanizm unieruchamiający złożone pokrywy na tułowiu (Gorb 1998).

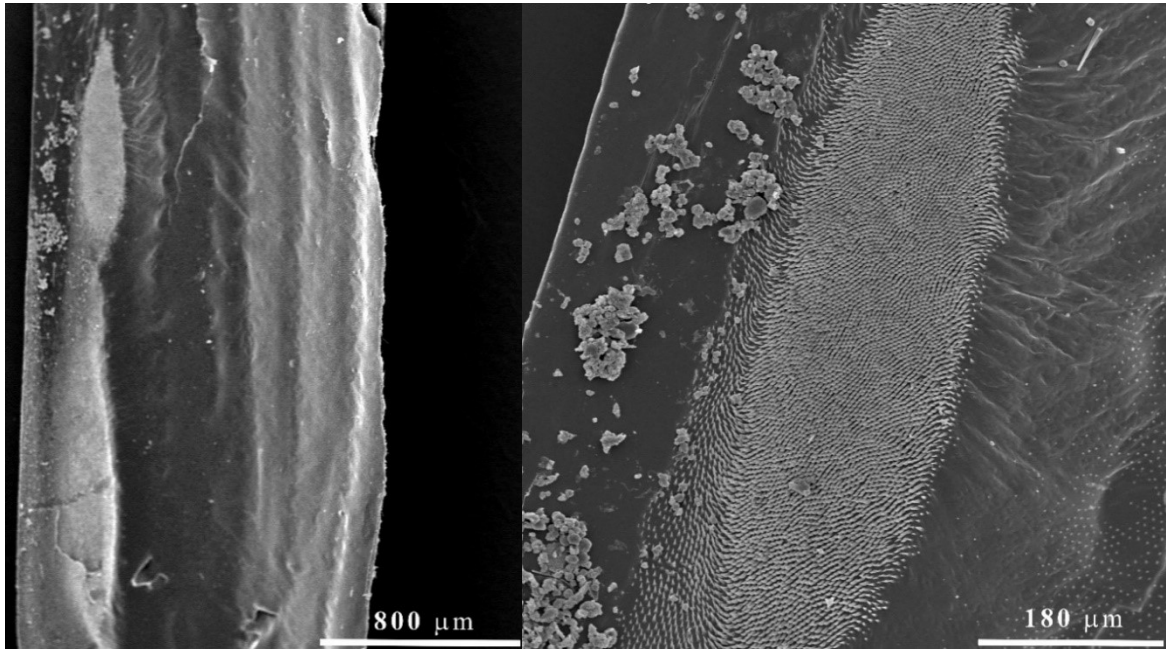
Podobnie, jak w przypadku pozostałych dwóch gatunków, przekroje poprzeczne uwidaczniają warstwową budowę pokryw. W porównaniu z pokrywami pozostałych dwóch gatunków warstwy te mają mniejszą grubość ( $0.72 \pm 0.35 \mu\text{m}$ ; średnia odczytów z kilku zdjęć, z różnych ujęć). Kierunek mikrowłókien zmienia się z każdą kolejną warstwą o ok. 30-35°.



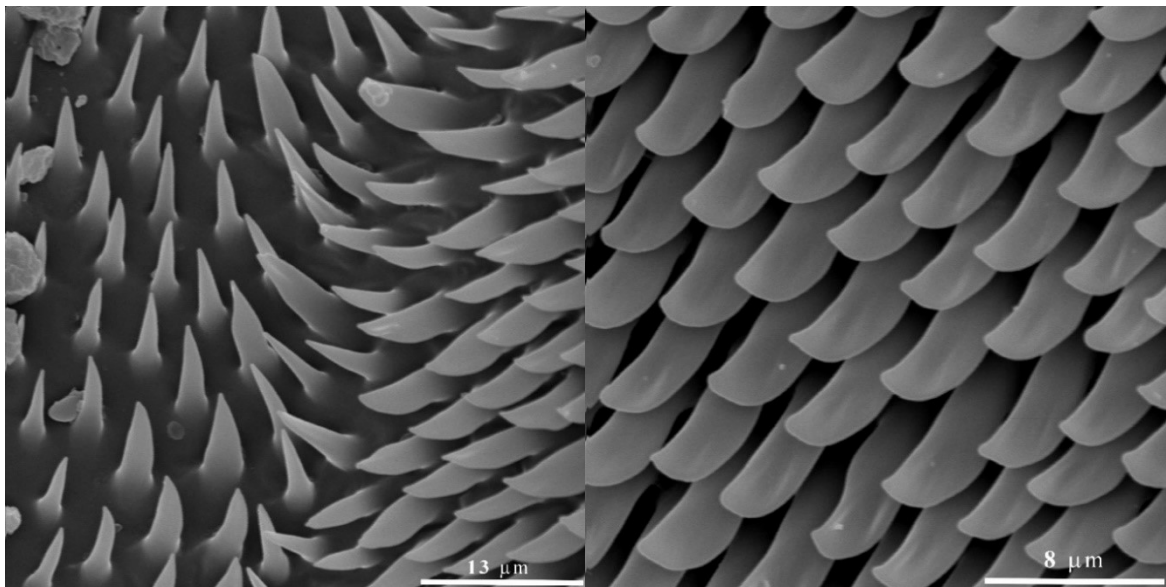
Rysunek 23 Strona grzbietowa pokrywy *T. molitor*



Rysunek 24 Przekroje poprzeczne przez pokrywę *T. molitor*



Rysunek 25 Strona brzuszna pokrywy *T. molitor*



Rysunek 26 Mikrowłoski w centralnej części brzusznej strony pokryw *T. molitor*

## 7.2 Analiza izotermy sorpcyjnej

### 7.2.1 Konstrukcja izotermy sorpcyjnej

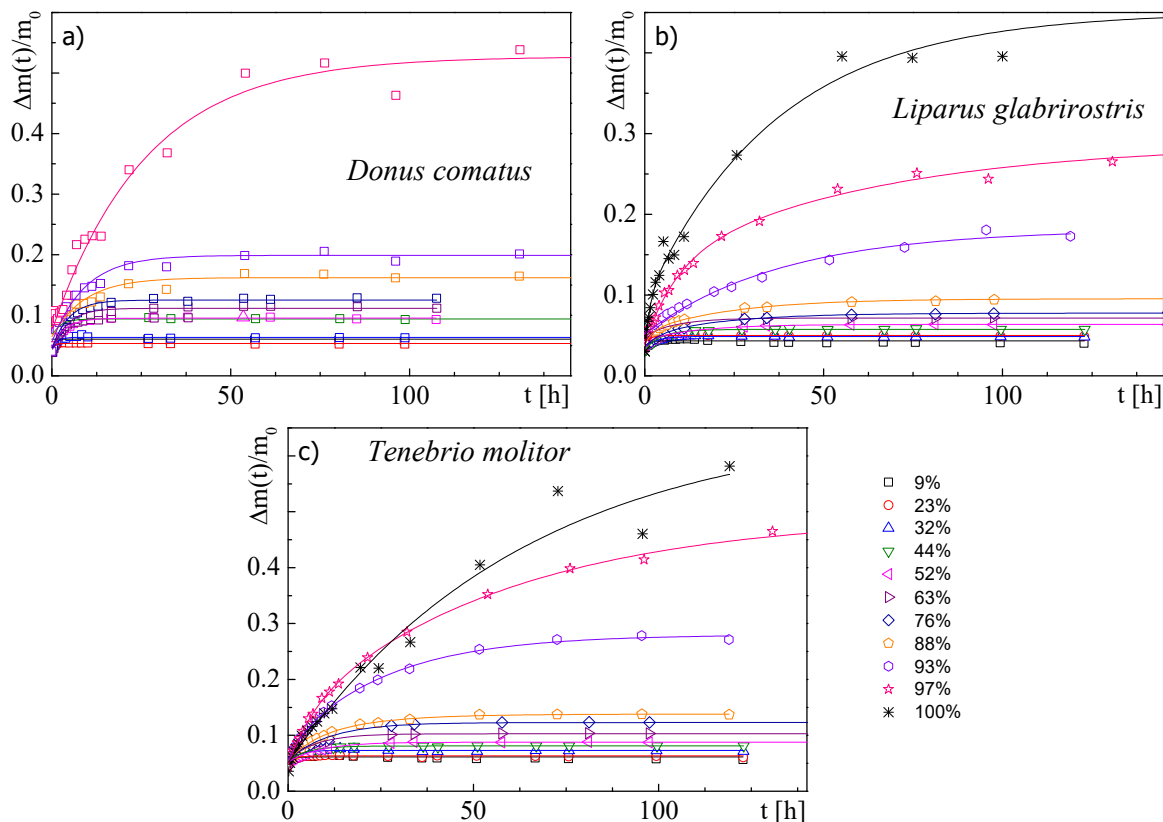
Wartości nasyceniowe uwodnienia próbki dla danej wartości wilgotności względnej  $h$  wyznaczono przez dopasowanie funkcji będącej sumą dwóch funkcji eksponencjalnych, jakie opisują sorpcję kolejnych frakcji wody:

$$\Delta m(t) = \frac{m(t) - m_0}{m_0} = A_0 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{t_1^h}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{t_2^h}\right), \quad (115)$$

gdzie  $t_i^h$  jest czasem uwodnienia danej składowej,  $A_0$  uwodnieniem początkowym (woda nieusuwalna w  $h = 0$ ), zaś  $A_i$  są przyrostami poziomu hydratacji dla danej wilgotności otoczenia (patrz Rys. 27). Suma

$$C^h = A_0 + A_1 + A_2 \quad (116)$$

jest równowagowym poziomem uwodnienia materiału i wykreślona w funkcji wilgotności względnej  $h$  tworzy izotermę sorpcyjną.



Rysunek 27 Kinetyki hydratacji pokryw badanych chrząszczy. Linie ciągłe – dopasowanie funkcji (115). Szczegółowa analiza kinetyki hydratacji pokryw *L. glabrirostris* i *D. comatus* została przedstawiona w pracy (Florek 2010)

## 7.2.2 Porównanie modeli izoterm sorpcyjnych

Omówione w rozdziale 4.3 modele izoterm sorpcyjnych wyrażają całkowitą objętość zaadsorbowanej wody, jednak do analizy danych doświadczalnych zostały one przetransformowane do funkcji opisującej przyrost masy próbki (mierzony grawimetrycznie) unormowany względem suchej masy próbki  $m_0$ , wyznaczonej po zakończeniu pomiarów. Zamiast parametru  $V_{mono}$ , czyli objętości sorbatu pokrywającego monowarstwę, pojawia się czynnik  $m_{mono}/m_0$ , gdzie  $m_{mono}$  jest masą tejże monowarstwy.

Do danych uzyskanych z kinetyki hydratacji dopasowano cztery modele sorpcji wielowarstwowej, a mianowicie trzy wersje modelu GAB, różniące się między sobą rozkładem ciepła sorpcji w obrębie wielowarstwy (patrz podrozdział 4.3.4), oraz model GDW (patrz podrozdział 4.3.6). W dalszej części pracy zostały określone jako model  $GAB_1$ ,  $GAB_2$ ,  $GAB_3$  i model GDW:

$$GAB_1: C_h = \frac{m(t) - m_0}{m_0} = \frac{m_{mono}}{m_0} \frac{(c'kh)}{(1 - kh)(1 + (c' - 1)kh)}, \quad (117)$$

$$GAB_2: C_h = \frac{m(t) - m_0}{m_0} = \frac{m_{mono}}{m_0} \frac{ch(1 + h)}{(1 - h)((1 - h)^2 + ch)}, \quad (118)$$

$$GAB_3: C_h = \frac{m(t) - m_0}{m_0} = \frac{m_{mono}}{m_0} \frac{ch}{(1 - h)(1 - c \ln(1 - h))}, \quad (119)$$

$$GDW: C_h = \frac{m(t) - m_0}{m_0} = \frac{m_{mono}}{m_0} \frac{Kh}{1 + Kh} \frac{1 - k(1 - w)h}{1 - kh}. \quad (120)$$

Wcześniejsze próby analizy procesu prowadzonej z fazy gazowej hydratacji pokryw chrząszczy za pomocą izotermy BET nie dały satysfakcjonujących rezultatów (Florek 2010; Harańczyk, Florek, i in. 2012), więc nie testowano tego modelu.

Dopasowane do testowanych modeli sorpcji wielowarstwowej krzywe przedstawiono na rys. 21-23, zaś parametry ich równań w Tabeli 3. Wstępna analiza wykresów izoterm doświadczalnych z dopasowaniami modeli oraz duże wartości parametru  $\chi^2$  (patrz Tab. 3) wskazują, że modele GAB z ciepłem adsorpcji zmieniającym się w obrębie wielowarstwy (czyli  $GAB_2$  oraz  $GAB_3$ ) niezadawalająco opisują sorpcję wody na pokrywach, widoczne to jest zwłaszcza dla wysokich wilgotności względnych. Warto jednak zauważyć, że do wilgotności  $h \approx 0.7$  wartości przewidziane modelem  $GAB_3$  są bardzo zbliżone do tych z

modelu GAB<sub>1</sub>. Masy wody wysycającej monowarstwę w obu modelach są, w granicach niepewności pomiarowej, sobie równe.

W przypadku modelu GDW rozszerzenie równania izoterm o dodatkowy parametr poprawia jakość dopasowania, jednak przy tak małej liczbie danych doświadczalnych może dojść do przeuczenia modelu. By zweryfikować, czy model GDW jest istotnie lepszy od trójparametrowych izoterm (dopasowanych modelem GAB), zastosowano kryterium informacyjne Akaikego, które oceniając wiarygodność modelu „karze” go za nadmiarowe parametry (Akaike 1992). Zgodnie z nim modelem opisującym dane w najlepszy sposób jest ten, dla którego najmniejsza jest wielkość zdefiniowana jako:

$$AIC = -2 \sum_j^n \ln \hat{\pi}_j + 2q, \quad (121)$$

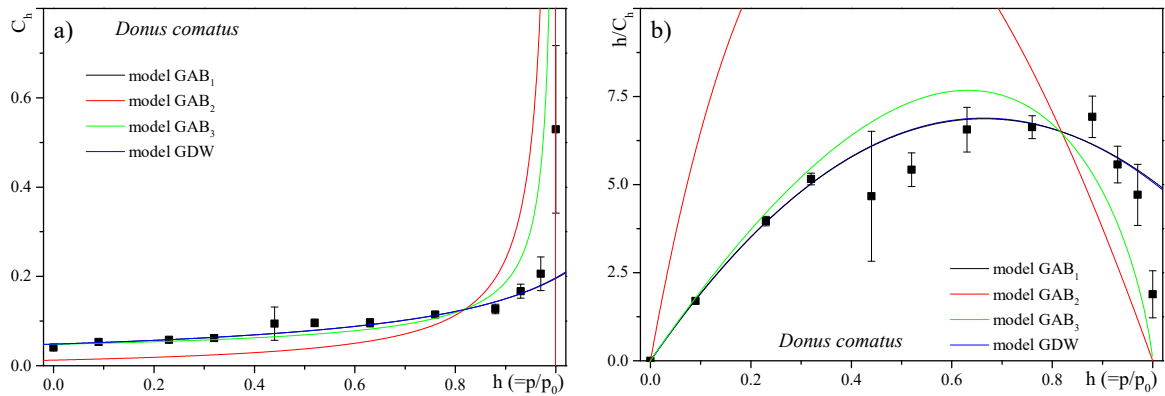
gdzie  $\hat{\pi}_j$  to estymowane prawdopodobieństwo, przy założeniach danego modelu, uzyskania dokładnie takiej wartości obserwacji  $j$ , jaka rzeczywiście była uzyskana;  $q$  oznacza liczbę parametrów tego modelu. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Originlab, wartości parametru AIC przedstawiono w tabeli 4. Bezwzględne wartości AIC nie niosą informacji na temat jakości dopasowania, dopiero wagi Akaikego określone wzorem

$$w_i = \exp(-0.5 \cdot \Delta AIC) / (1 + \exp(-0.5 \cdot \Delta AIC)) \quad (122)$$

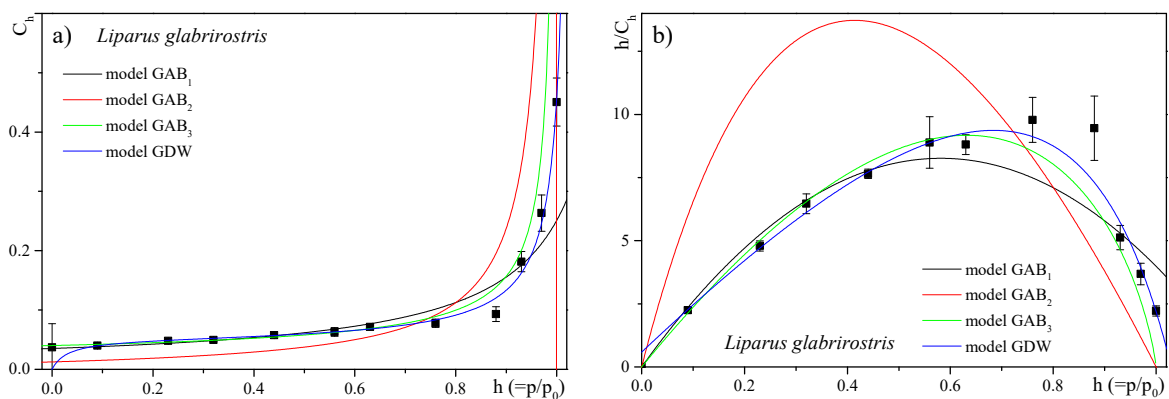
gdzie  $\Delta AIC$  jest różnicą między wartościami AIC dla porównywanych modeli, określają prawdopodobieństwo tego, że jeden z dwóch porównywanych modeli jest wiarygodniejszy.

Dla pokryw każdego z gatunków najlepiej przybliżał dane doświadczalne inny model. Dla *L. glabrirostris* - model GDW okazał się być 2587 razy bardziej prawdopodobny niż model GAB<sub>1</sub>, dla *T. molitor* model GAB<sub>3</sub> jest 6.5 raza bardziej prawdopodobny niż model GDW, wreszcie dla *D. comatus* najtrafniejszym okazał się być model GAB<sub>1</sub>, ponieważ wydaje się, że jest 23 razy bardziej wiarygodny niż model GDW). Kompletnie porównanie analizowanych modeli przedstawiono na Rys. 31.

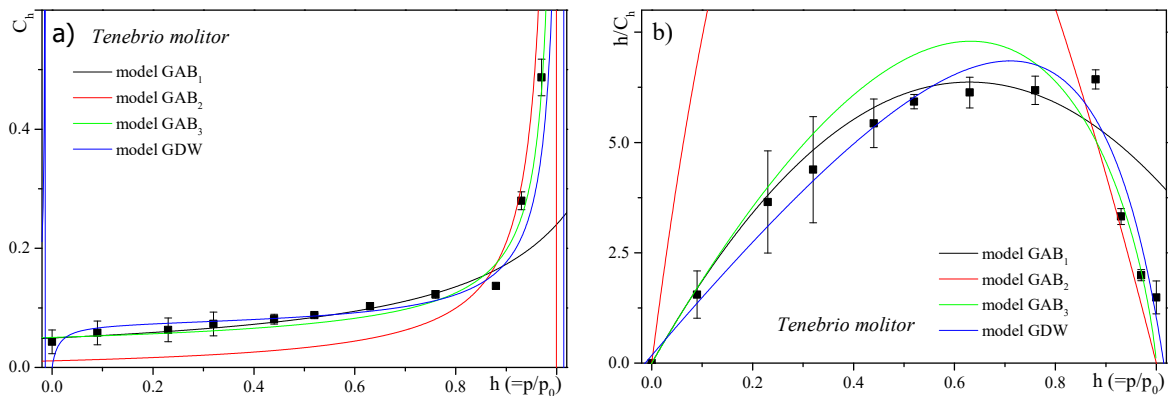




Rysunek 28 Izotermi sorpcyjne (118)-(121) oraz ich postaci wielomianowe dla *D. comatus* (linia dla modelu GAB<sub>1</sub> pokrywa się z linią dla modelu GDW)



Rysunek 29 Izotermi sorpcyjne (118)-(121) oraz ich postaci wielomianowe dla *L. glabrirostris*



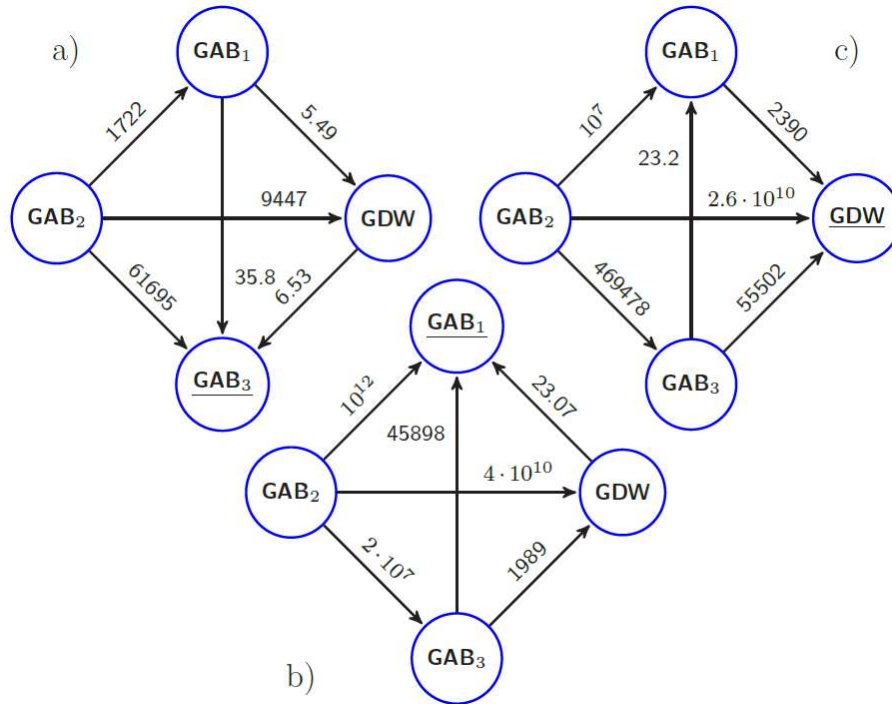
Rysunek 30 Izotermi sorpcyjne (118)-(121) i ich postaci wielomianowe dla *T. molitor*

Tabela 3 Parametry dopasowań równań izoterm sorpcyjnych (118)-(121)

		<i>D. comatus</i>		<i>L. glabrirostris</i>		<i>T. molitor</i>	
Parametr		Wartość	$\chi^2$	Wartość	$\chi^2$	Wartość	$\chi^2$
GAB <sub>1</sub>	$m_{mono}/m_0$	0.0484±0.0012	1.3	0.0352±0.0027	7.1	0.0494±0.0075	17.7
	$k$	0.753±0.023		0.860±0.034		0.794±0.069	
	$c'$	$(5.2±2.8)·10^8$		$1.33·10^{28}±3.37·10^{40}$		$(6.7±102)·10^6$	
GAB <sub>2</sub>	$m_{mono}/m_0$	0.0126±0.0097	169	$(12.5±4.2)·10^{-3}$	141	0.0111±0.0021	81
	$c$	$(5.22±219)·10^{44}$		$(2.25±2610000)·10^{24}$		$(2.17±1100)·10^{43}$	
GAB <sub>3</sub>	$m_{mono}/m_0$	0.0479±0.0027	10	$(40.1±2.6)·10^{-3}$	16	0.0504±0.0031	13
	$c$	$(5.5±8.6)·10^8$		$(1.18±66)·10^7$		$(5.8±66)·10^6$	
GDW	$m_{mono}/m_0$	0.04852±0.0025	1.4	0.0517±0.0032	1.3	0.074±0.020	8.9
	$K$	$(5.1±3.2)·10^8$		33±13		77±660	
	$k$	0.760±0.087		0.9713±0.0048		0.9855±0.0062	
	$w$	0.97±0.37		0.240±0.047		0.179±0.068	

Tabela 4 Wartości parametrów AIC (Informacyjnego Kryterium Akaikego dla analizowanych modeli izoterm

model	<i>D. comatus</i>	<i>L. glabrirostris</i>	<i>T. molitor</i>
GAB <sub>1</sub>	13.3	33.8	44.7
GAB <sub>2</sub>	68.4	66.2	59.6
GAB <sub>3</sub>	34.7	40.1	37.6
GDW	19.5	18.3	41.3



Rysunek 31 Schematyczne przedstawienie wag Akaikego dla analizowanych modeli sorpcji wielowarstwowej w pokrywach a) *T. molitor*, b) *D. comatus*, i c) *L. glabrirostris*. Strzałki wskazują lepszy z porównywanych parami modeli, wartości liczbowe oznaczają stosunek wag Akaikego danych modeli

Innym sposobem oceny stosowalności danego modelu izotermy sorpcyjnej jest przedstawienie danych jako zależność  $C_h/h$  w funkcji wilgotności względnej  $h$ . Dla izotermy GAB<sub>1</sub> otrzymuje się parabolę

$$\frac{h}{C_h} = Ah^2 + Bh + C \quad (123)$$

o współczynnikach równych

$$A = \frac{k}{\frac{m_{mono}}{m_0} \left( \frac{1}{c'} - 1 \right)}$$

$$B = \frac{1}{\frac{m_{mono}}{m_0} \left( 1 - \frac{2}{c'} \right)} \quad (124)$$

$$C = \frac{1}{\frac{m_{mono}}{m_0} c' k},$$

a w szczególnym przypadku izotermy BET, czyli gdy  $k = 1$ , otrzymuje się parabolę o miejscu zerowym dla  $h = 1$ . Dla wielu materiałów biologicznych symetryczna izoterma

paraboliczna bardzo dobrze opisuje sorpcję wody (Harańczyk 2003; Harańczyk i in. 2008; Harańczyk, Pater, i in. 2012), jednak w przypadku pokryw skrzydłowych zależność  $h/C_h$  wykazuje silną asymetrię prawostronną. Z tego powodu podważona została słuszność dopasowania izotermy GAB<sub>2</sub>, która przekształcona do funkcji  $h/C_h$  niezależnie od wartości parametru  $c$  ma maksimum przesunięte w stronę niskich uwodnień (położenie maksimum funkcji  $h/C_h(h)$  dla  $c > 0$  zawiera się w zakresie  $h \in [0, -1 + \sqrt{2}]$ ).

W przypadku przetransformowanej izotermy GAB<sub>3</sub> maksimum takiego rozkładu występuje dla wilgotności względnych  $h \in [0, (-1+e)/e]$ , czyli do  $h \approx 0.63$ , co odpowiada danym doświadczalnym dla pokryw.

Równie dobrze opisuje dane w postaci  $h/C_h$  izoterma GDW, która dla niskich wartości parametru  $w$  staje się mocno asymetryczna i może opisywać nietypowe mechanizmy sorpcyjne.

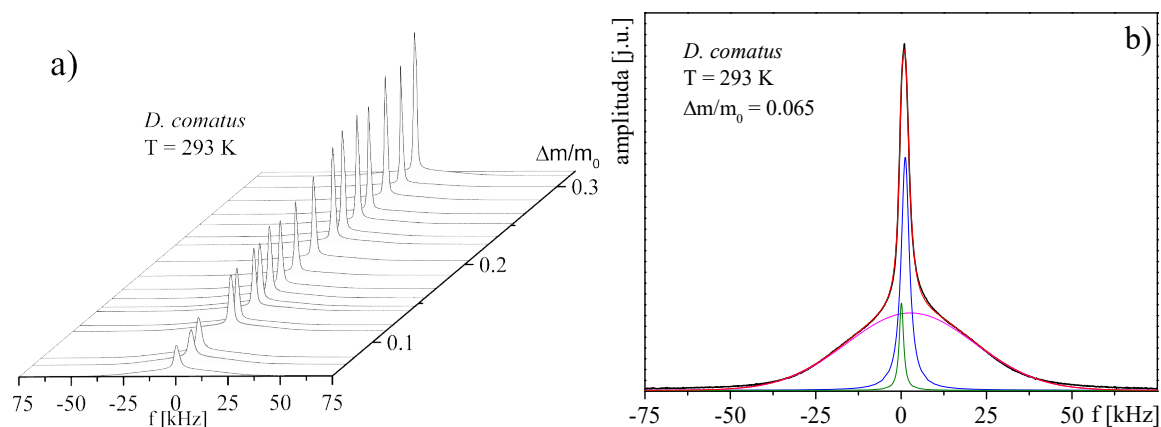
Otrzymane wartości masy wody wysycającej monowarstwę zależą od modelu i mieszczą się w zakresach 0.048-0.049, 0.035-0.052, 0.049-0.074, kolejno dla *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor*. Masa takiej monowarstwy może zostać użyta do wyznaczenia powierzchni sorbentu dostępnej dla wody  $S_0$ :

$$S_0 = \frac{1}{M_s} N_0 A m_{mono} \left[ \frac{m^2}{g} \right] \quad (125)$$

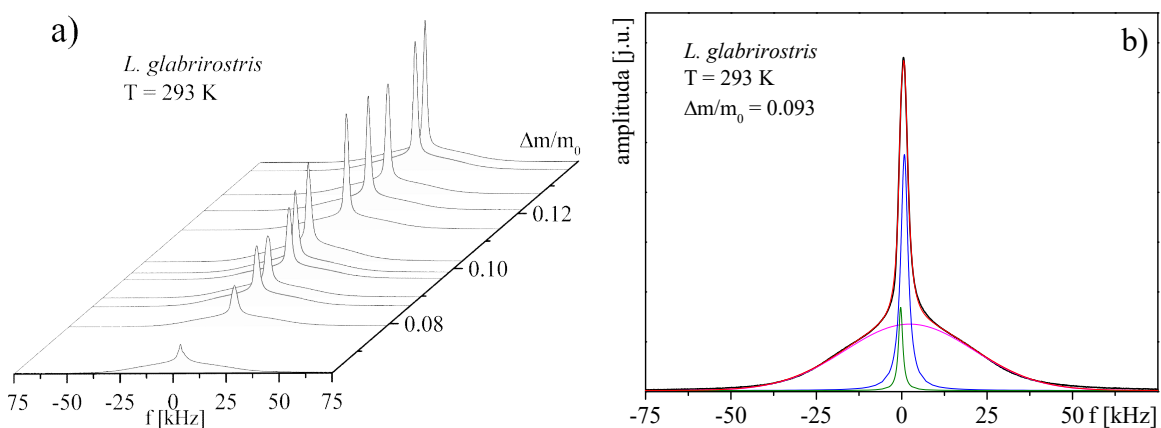
gdzie  $M_s$  jest masą cząsteczkową wody (= 18),  $N_0$  liczbą Avogadro, zaś  $A$  jest średnią powierzchnią zajmowaną przez cząsteczkę wody (=  $1.05 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2$ ) (Ariahu i in. 2006). Dla parametrów najlepiej dopasowanej izotermy otrzymano powierzchnię dostępną dla wody równą odpowiednio 170, 124 i 177  $\text{m}^2/\text{g}$  dla *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor*. Wartości te są zbliżone do tych otrzymanych dla innych heterogennych układów biologicznych: dla silnie schitynizowanego ciała raka *Procambarus clarkii* powierzchnia dostępna dla wody wynosi 118  $\text{m}^2/\text{g}$  (Ariahu i in. 2006), dla plechy grzyba zlichenizowanego *Ramalina terebrata* – 131.4  $\text{m}^2/\text{g}$  (Harańczyk, Pater, i in. 2012), dla ziaren komosy – 298  $\text{m}^2/\text{g}$  (Tolaba i in. 2004).

## 7.3 Analiza kształtu linii $^1\text{H-NMR}$

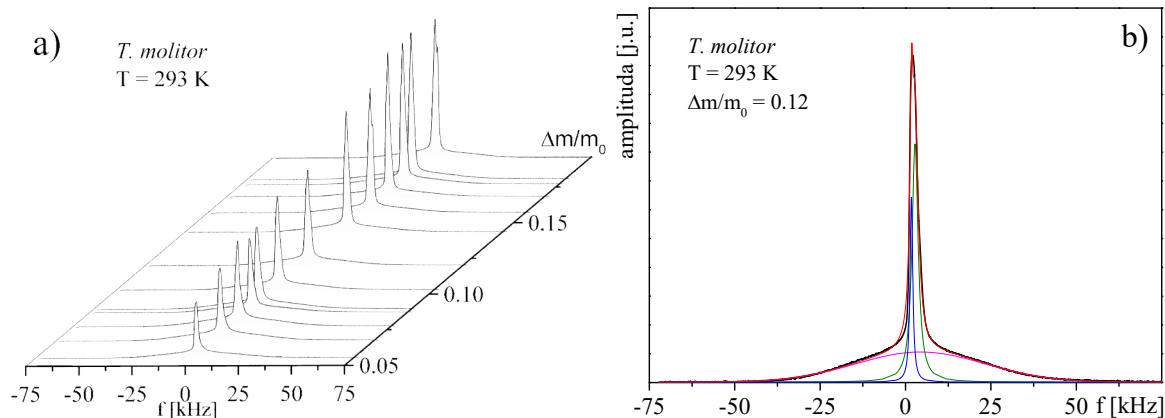
Dla wszystkich przebadanych pokryw zaobserwowano kilka linii  $^1\text{H-NMR}$  w bardzo niewielkim stopniu przesuniętych względem siebie (różnica w położeniach centrów linii nie przekraczała 1 kHz). Mimo to wymiana między różnymi pulami protonów jest na tyle wolna, że dla pokryw każdego gatunku udało się wyodrębnić co najmniej dwie linie. Zmierzone widma  $^1\text{H-NMR}$  są superpozycją szerszej ( $f_{1/2} \approx 45$  kHz) linii, o amplitudzie względnie niezależnej od poziomu uwodnienia materiału, oraz węższej, o szerokości połówkowej kilku kHz, jaka narasta wraz ze zwiększającym się poziomem hydratacji próbki (patrz Rys. 32a-34a).



Rysunek 32 a) Przykładowe widma  $^1\text{H-NMR}$  zmierzone dla pokryw *D. comatus* w funkcji poziomu uwodnienia, b) Przykład dekompozycji widma na składowe: funkcja Gaussa (linia różowa), funkcje Lorentza (linia zielona oraz niebieska)



Rysunek 33 a) Przykładowe widma  $^1\text{H-NMR}$  zmierzone dla pokryw *L. glabrirostris* w funkcji poziomu uwodnienia, b) Przykład dekompozycji widma na składowe: funkcja Gaussa (linia różowa), funkcje Lorentza (linia zielona oraz niebieska)



Rysunek 34 a) Przykładowe widma  $^1\text{H-NMR}$  zmierzone dla pokryw *T. molitor* w funkcji poziomu uwodnienia, b) Przykład dekompozycji widma na składowe: funkcja Gaussa (linia różowa), funkcje Lorentza (linie zielona oraz niebieska)

W niektórych przypadkach możliwe było rozdzielenie tej drugiej na dwie jeszcze węższe linie przesunięte względem siebie (patrz Rys. 34b-32b). Wąskie linie zostały zinterpretowane jako sygnał pochodzący od protonów mobilnych, a więc pochodzący od wody obecnej w układzie. Jak wspomniano w podrozdziale 5.5.2 linie takie są najczęściej modelowane przez funkcję Lorentza (107).

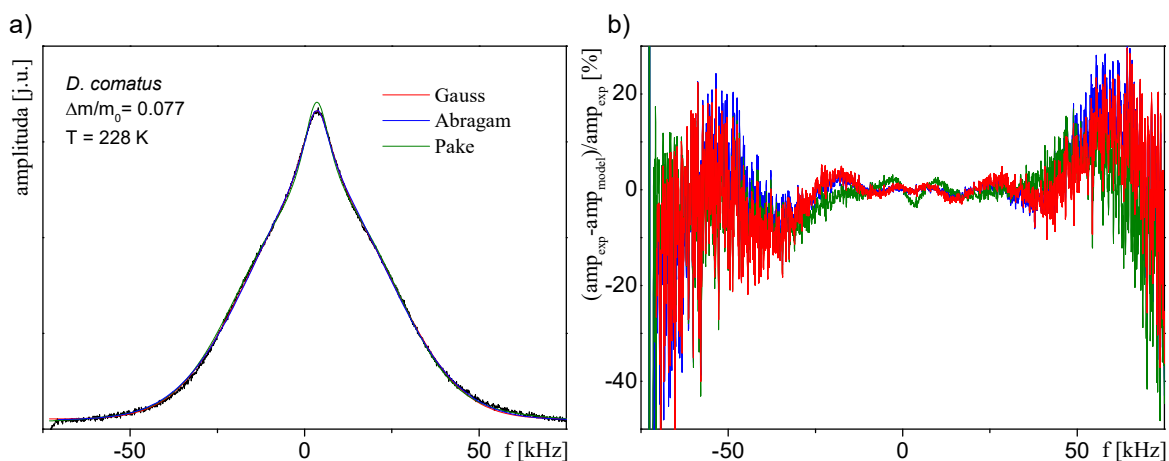
By określić najlepszy sposób opisu sygnału pochodzącego od mniej mobilnych protonów dokonano dla najniższych zmierzonych temperatur dopasowań szerokiej linii funkcją Gaussa (112), sumą dwóch poszerzonych dipolowo dubletów Pake'a (109) oraz funkcją Abragama (111). Na rysunkach poniżej przedstawiono porównanie dopasowań modeli teoretycznych. Dla większej czytelności wykresów nie rozdzielono sygnału cieczowego (funkcja Lorentza) sygnału od fazy stałej próbki (funkcja Gaussa, Pake'a lub Abragama). Ponieważ różnice między dopasowanymi krzywymi są słabo widoczne, do każdego zestawu danych dołączono wykres z funkcjami rezydualnymi dopasowań, tzn. różnicą między dopasowaną krzywą a punktami doświadczalnymi wyrażonymi w procentach mierzonego sygnału, które pozwalają intuicyjnie ocenić rodzaj rozbieżności między danym dopasowaniem a danymi.

Porównania jakości dopasowania i ich parametry zostały zebrane w Tab. 5 (nie uwzględniono w niej nieistotnych dla tej analizy położenia linii ani parametrów linii cieczowej).

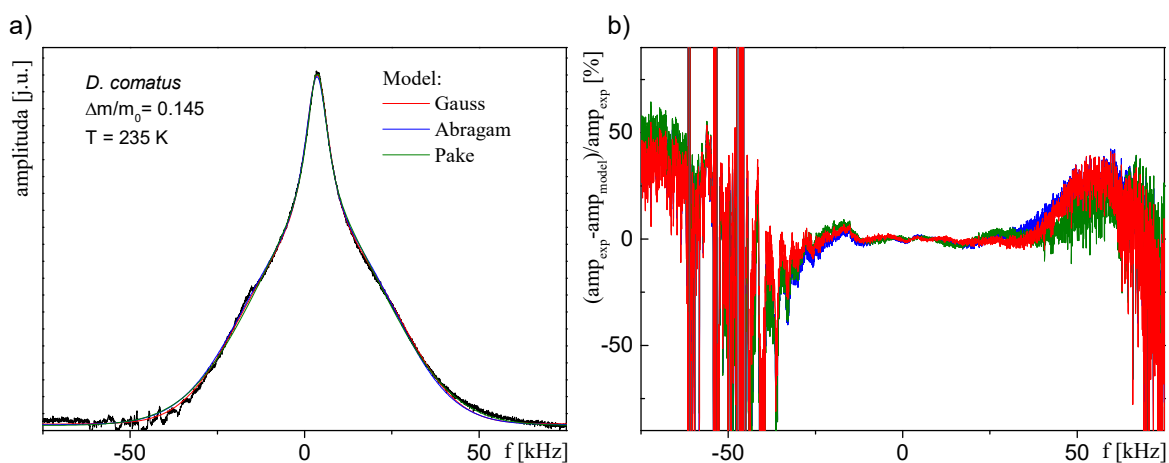
Parametr  $a$  w dublecie Pake'a, równy połowie rozszczępienia linii (patrz Rys. 14), jest proporcjonalny do stałej sprzężenia dipolowego zdefiniowanej równaniem (74), dzięki czemu możliwe jest wyznaczenie średniej odległości między jądrami oddziałującymi

dipolowo. Zakładając, że oddziałujące pary jąder to proton-proton lub proton-węgiel, obliczono odległości  $r_{HH}$  oraz  $r_{CH}$  odpowiadające dopasowanym do sygnału od fazy stałej próbek (patrz Tab. 6).

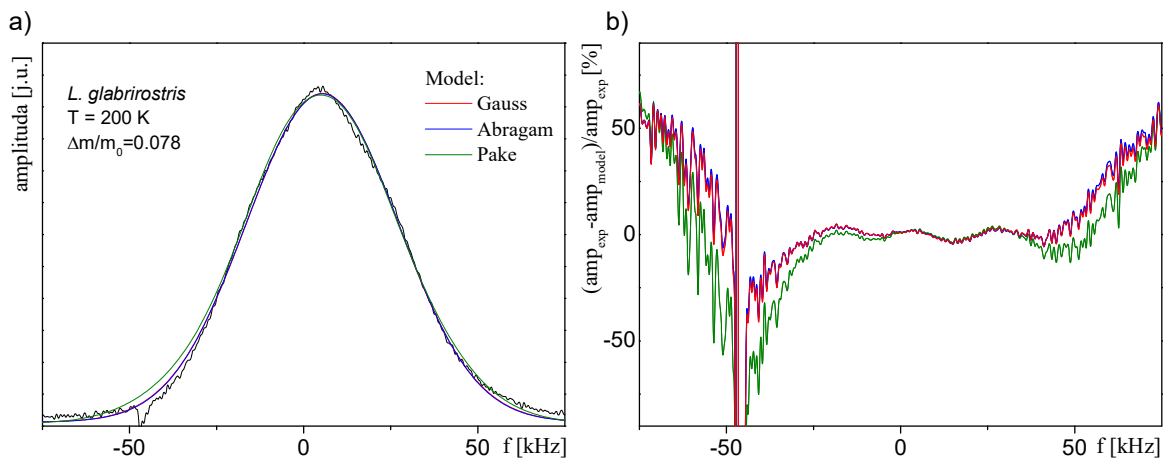
Biorąc pod uwagę wartości współczynnika determinacji  $R^2$  dopasowań uznano jednak, że do modelowania widma pochodzącego od matrycy stałej w dalszej części pracy wystarczy funkcja Gaussa o szerokości połówkowej równej 40-55 kHz.



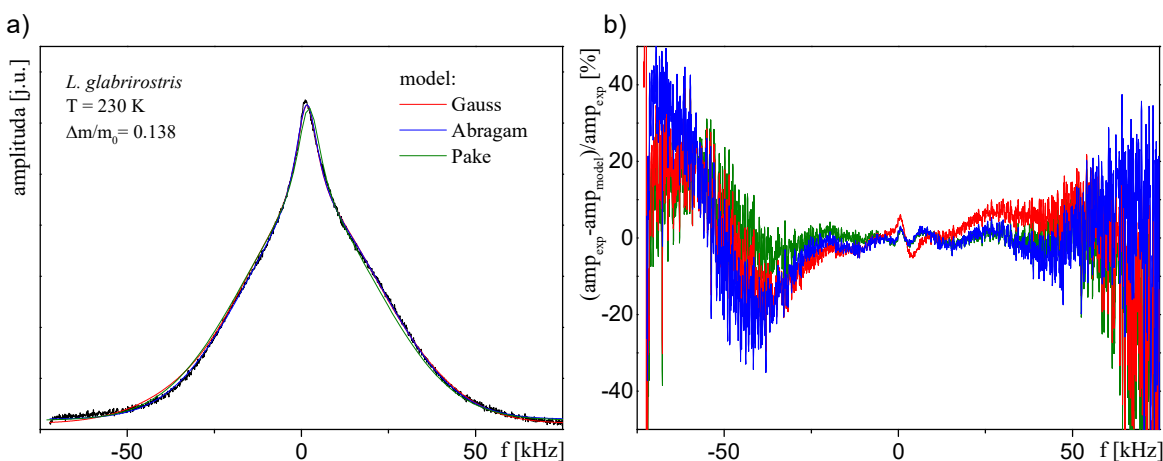
Rysunek 35 Porównanie modeli opisujących sygnał  $^1\text{H-NMR}$  pochodzący od fazy stałej pokryw *D. comatus* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.077$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania



Rysunek 36 Porównanie modeli opisujących sygnał  $^1\text{H-NMR}$  pochodzący od fazy stałej pokryw *D. comatus* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.145$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania

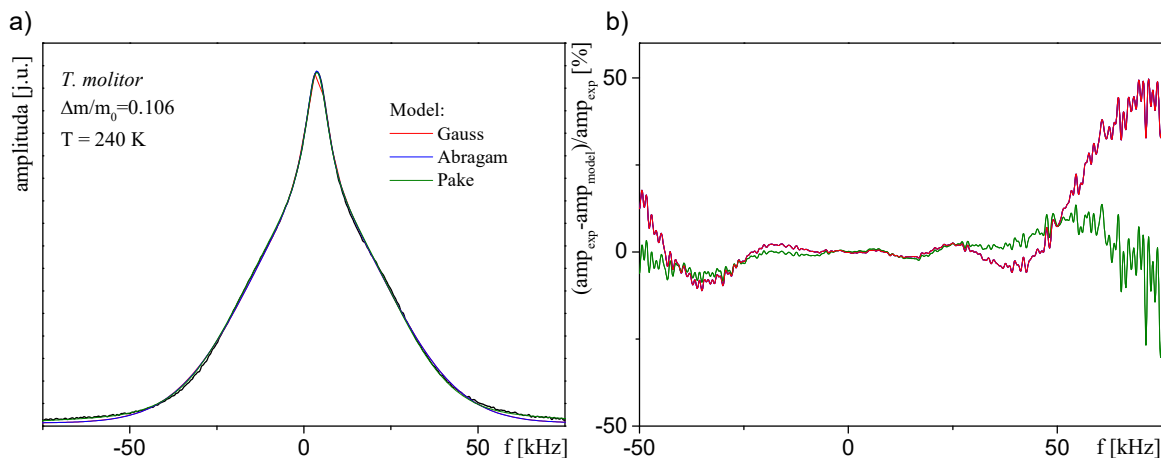


Rysunek 37 Porównanie modeli opisujących sygnał  $^1\text{H-NMR}$  pochodzący od fazy stałej pokryw *L. glabrirostris* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.087$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów ciekowych) b) funkcja rezydualna dopasowania

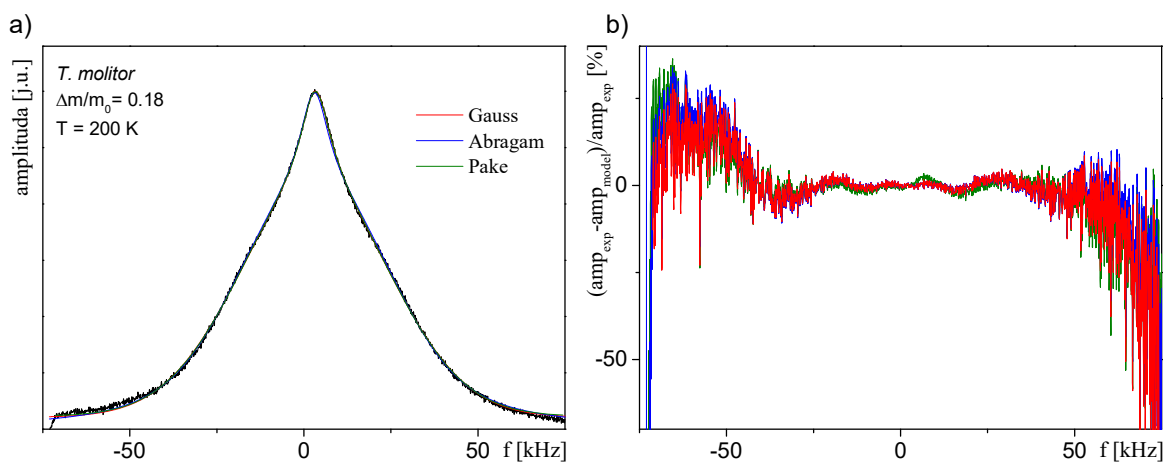


Rysunek 38 Porównanie modeli opisujących sygnał  $^1\text{H-NMR}$  pochodzący od fazy stałej pokryw *L. glabrirostris* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.138$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów ciekowych) b) funkcja rezydualna dopasowania





Rysunek 39 Porównanie modeli opisujących sygnał <sup>1</sup>H-NMR pochodzący od fazy stałej pokryw *T. molitor* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.106$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów ciekłych; dopasowanie funkcją Gaussa praktycznie pokrywa się z dopasowaniem funkcją Abragama) b) funkcja rezydualna dopasowania



Rysunek 40 Porównanie modeli opisujących sygnał <sup>1</sup>H-NMR pochodzący od fazy stałej pokryw *T. molitor* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.18$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów ciekłych) b) funkcja rezydualna dopasowania



Tabela 5 Parametry dopasowań linii odpowiadających protonom ciała stałego

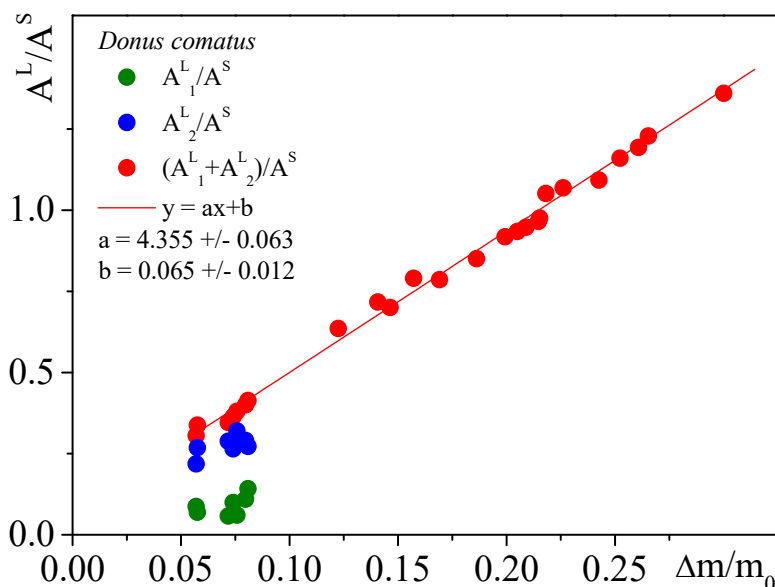
gatunek	$\Delta m/m_0$	Temp [K]	Model: funkcja Gaussa		Model: funkcja Abragama			Model: dwa poszerzone dublety Pake'a				
			$f_{1/2}$ [kHz]	Skorygowany współczynnik R <sup>2</sup>	$a$ [kHz]	$b$ [kHz]	Skorygowany współczynnik R <sup>2</sup>	$a_1$ [kHz]	$f_{1/2}$ funkcji Gaussa [kHz]	$a_2$ [kHz]	$f_{1/2}$ funkcji Gaussa [kHz]	Skorygowany współczynnik R <sup>2</sup>
<i>L. glabrirostris</i>	0.087	200	51.199	0.9973	19.614	15.735	0.997	11.598	21.303	25.336	29.316	0.9948
<i>L. glabrirostris</i>	0.138	240	48.919	0.999	20.739	2.092	0.9990	14.770	26.867	34.659	63.810	0.9994
<i>T. molitor</i>	0.106	230	49.52	0.9963	17.772	18.039	0.9992	11.864	18.032	23.199	29.223	0.9983
<i>T. molitor</i>	0.18	223	54.16	0.9993	21.76	4.498	0.9991	14.779	27.973	24.599	56.963	0.9990
<i>D. comatus</i>	0.077	228	47.846	0.9993	15.554	21.587	0.9993	16.691	23.426	26.92	65.245	0.9990
<i>D. comatus</i>	0.145	235	45.929	0.9977	12.419	24.380	0.9983	54.338	22.293	19.053	22.700	0.9976

Tabela 6 Odległości  $r_{HH}$  oraz  $r_{CH}$  odpowiadające dopasowanemu parametrowi rozszczepienia dubletu Pake'a

	$\Delta m/m_0$	$T$ [K]	$a_1$ [kHz]	$r_{HH}$ [Å]	$r_{CH}$ [Å]	$a_2$ [kHz]	$r_{HH}$ [Å]	$r_{CH}$ [Å]
<i>L. glabrirostris</i>	0.087	200	11.598	1.98	1.09	25.336	1.53	0.84
<i>L. glabrirostris</i>	0.138	240	14.770	1.83	1.00	34.659	1.37	0.76
<i>T. molitor</i>	0.106	230	11.864	1.96	1.08	23.199	1.57	0.86
<i>T. molitor</i>	0.18	223	14.779	1.83	1.00	24.599	1.54	0.85
<i>D. comatus</i>	0.077	228	16.691	1.75	0.97	26.92	1.50	0.82
<i>D. comatus</i>	0.145	235	54.338	1.18	0.65	19.053	1.68	0.92

## 7.4 Zależności hydratacyjne widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw *Donus comatus*, *Liparus glabrirostris* oraz *Tenebrio molitor*

Do widm  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *D. comatus*, *L. glabrirostris* oraz *T. molitor*, zarejestrowanych po impulsie  $\pi/2$  dopasowano sumę funkcji Gaussa oraz jednej lub dwóch funkcji Lorentza. Amplituda sygnału FID, a więc i pole pod linią w domenie częstotliwości, jest proporcjonalne do liczby protonów rezonansowych (patrz równanie (61)). Dokonano analizy pól linii składowych widm zmierzonych w funkcji poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0$  oraz temperatury. Pole pod liniami cieczowymi wyrażono w jednostkach pola pod linią ciała stałego  $A^L/A^S$ .



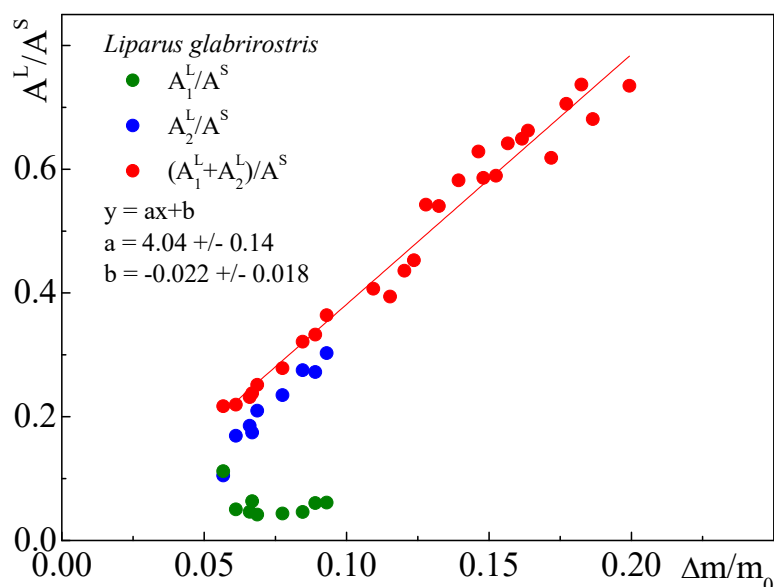
Rysunek 41 Zależność sygnału od protonów mobilnych w widmie  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *D. comatus* wyrażony w jednostkach pola pod sygnałem pochodzącym od składowej stałej widma,  $A^L/A^S$ , a przedstawiony w funkcji poziomu hydratacji próbki. Zielonymi kropkami oznaczono udział sygnału od składowej  $L_1$ ,  $A_1^L/A^S$ , niebieskimi od składowej  $L_2$ ,  $A_2^L/A^S$ , wreszcie czerwonymi sumaryczny sygnał cieczowy

Wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia dla pokryw od wszystkich trzech gatunków chrząszczy stosunek sumarycznego sygnału pochodzącego od frakcji cieczowej do sygnału pochodzącego od frakcji ciała stałego  $A^L/A^S$  wzrasta liniowo. Dla niskich poziomów uwodnienia próbki możliwe było wyodrębnienie dwóch linii cieczowych, co można zinterpretować jako sygnały od wody ściśle i od wody luźno związanej do powierzchni matrycy stałej pokrywy. Wody ściśle związanej jest znacznie mniej i jej ilość pozostaje praktycznie stała podczas uwadniania próbki, narasta za to sygnał od wody luźno związanej.

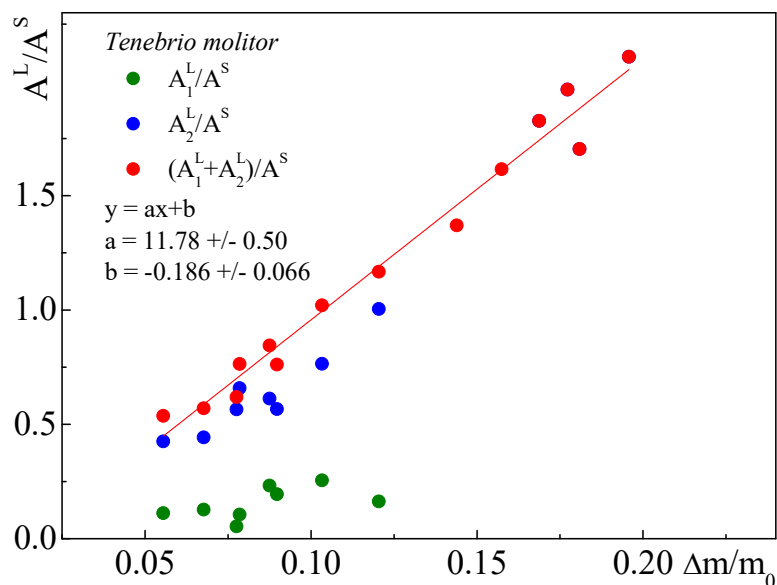
Powyżej granicznego poziomu uwodnienia wyodrębnienie sygnału pochodzącego od wody ściśle związanej staje się niemożliwe z powodów numerycznych, widoczna jest jedna uśredniona linia lorentzowska, w której dominuje sygnał od wody luźno związanej. Dla pokryw *D. comatus*, *L. glabrirostris*, *T. molitor* ta wartość graniczna uwodnienia wynosi odpowiednio ok. 0.08, 0.11 i 0.125. Udział frakcji cieczowej w całkowitym sygnale zmienia się zgodnie z równaniem

$$\frac{A^L}{A^S} = k \frac{\Delta m}{m_0} + \frac{A^{L_0}}{A^S}.$$

Współczynnik kierunkowy takiej prostej wynosi dla pokryw *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor* odpowiednio 4.355, 4.04 oraz 11.78. Obecność substancji paramagnetycznych w pokrywach uniemożliwia powiązanie parametru  $k$  z gęstościami protonowymi; istotna różnica w nachyleniu prostych dla różnych gatunków wynika najprawdopodobniej z różnego osłabienia sygnału od ciała stałego wynikającego z różnej zawartości paramagnetyków (Harańczyk i in. 2015). Parametr wolny prostej,  $A^{L_0}/A^S$ , a więc wartość  $A^L/A^S$  dla  $\Delta m/m_0 = 0$ , przyjmuje wartości 0.065, -0.022, -0.186 odpowiednio dla *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor*. Dodatnia wartość tego parametru wskazuje na obecność niewielkiej ilości wody zapułkowanej w pokrywach *D. comatus*. Ujemny współczynnik kierunkowy sugeruje zaś, że we wstępnych fazach hydratacji pokryw *L. glabrirostris* i *T. molitor* woda zostaje zaadsorbowana do powierzchni na tyle mocno, że nie manifestuje się w pomiarach widm NMR jako wąska składowa cieczowa.



Rysunek 42 Zależność sygnału od protonów mobilnych w widmie  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *L. glabrirostris* wyrażony w jednostkach pola pod sygnałem pochodzącym od składowej stałej widma,  $A^L/A^S$ , a przedstawiony w funkcji poziomu hydratacji próbki. Zielonymi kropkami oznaczono udział sygnału od składowej  $L_1$ ,  $A_1^L/A^S$ , niebieskimi od składowej  $L_2$ ,  $A_2^L/A^S$ , wreszcie czerwonymi sumaryczny sygnał cieczowy



Rysunek 43 Zależność sygnału od protonów mobilnych w widmie  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *T. molitor* wyrażony w jednostkach pola pod sygnałem pochodzącym od składowej stałej widma,  $A^L/A^S$ , a przedstawiony w funkcji poziomu hydratacji próbki. Zielonymi kropkami oznaczono udział sygnału od składowej  $L_1$ ,  $A_1^L/A^S$ , niebieskimi od składowej  $L_2$ ,  $A_2^L/A^S$ , wreszcie czerwonymi sumaryczny sygnał cieczowy

Z transformacji Fouriera, jaka umożliwia przejście z domeny czasu do domeny częstotliwości, wynika związek między szerokością linii (zarówno opisanej funkcją Gaussa, jak i Lorentza), a czasem relaksacji poprzecznej. Zmierzona szerokość połówkowa linii odpowiada jednak nie rzeczywistemu czasowi  $T_2$ , lecz efektywnemu czasowi  $T_2^*$ , krótszemu od  $T_2$  (co wynika m. in. ze wspomnianego zjawiska „rozwiązania magnetyzacji w wachlarz”):

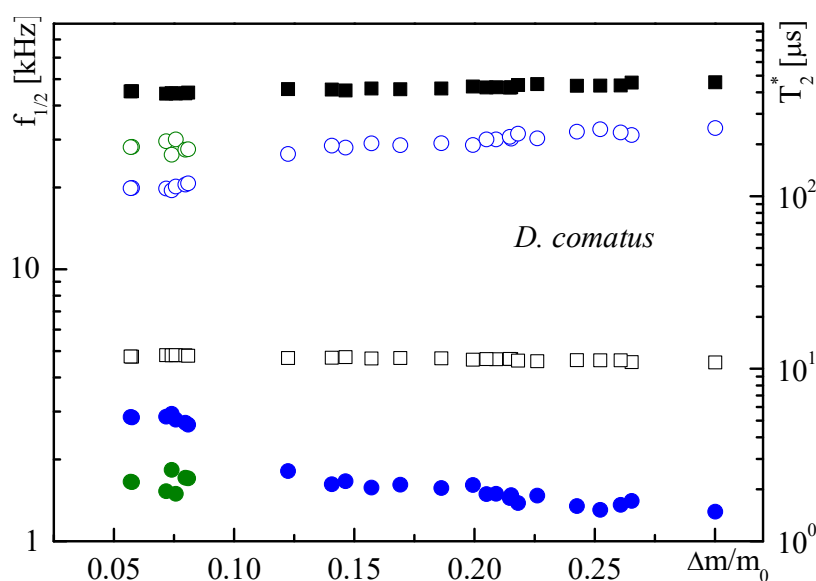
$$T_{2G}^* = \frac{4\sqrt{\ln(2)}}{\omega_{1/2}} = \frac{2\sqrt{\ln(2)}}{\pi f_{1/2}} \quad (126)$$

$$T_{2L}^* = \frac{2}{\omega_{1/2}} = \frac{1}{\pi f_{1/2}}$$

Szerokości połówkowe linii pochodzącej od ciała stałego dla wszystkich trzech gatunków zmieniają się w bardzo niewielkim stopniu zarówno przy zmianie poziomu uwodnienia, jak temperatury pokryw i wynoszą ok. 40-50 kHz, co odpowiada czasowi relaksacji  $T_2^* \approx 10 \mu\text{s}$ . Szerokości linii Lorentza opisujących frakcje cieczowe zawierały się w zakresie 0.7-10 kHz i były silnie zależne od temperatury; dolna granica jest bliska naturalnej szerokości linii dla spektrometru  $B_0$ , jaka wynika z niejednorodności pola magnetycznego o indukcji  $B_0$ .

### *D. comatus*

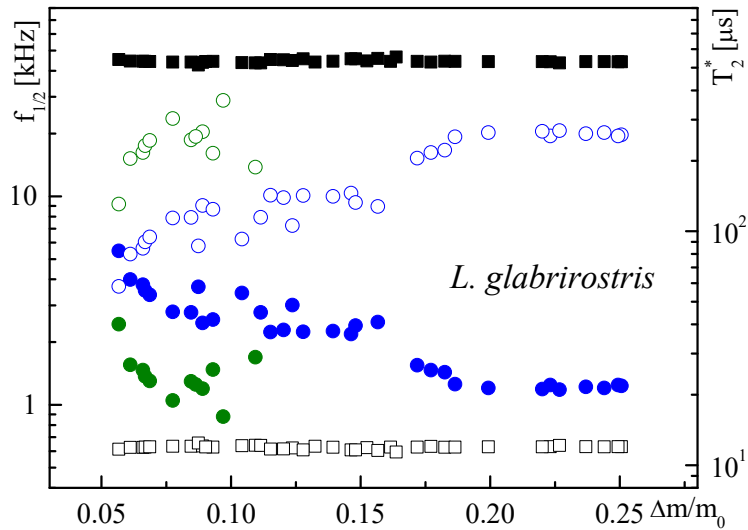
Dla niskich poziomów uwodnienia materiału możliwe było rozróżnienie sygnału od wody ściśle i luźno związanej do powierzchni matrycy stałej. Pierwsza z nich dawała wąską linię o szerokości połówkowej ok. 1.5 kHz, podczas gdy woda luźno związana manifestowała się jako dwukrotnie szersza linia. Powyżej poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.08$  wyodrębnienie sygnału pochodzącego od wody ściśle związanej staje się niemożliwe z powodów numerycznych, widoczna była tylko jedna linia, która stopniowo zwężała się z hydratacją pokryw od poziomu 2.2 kHz do 1.2 kHz (patrz Rys. 44).



Rysunek 44 Zależność hydratacyjna szerokości połówkowych linii Gaussa (■) oraz Lorentza (\*,\*) dla pokryw *D. comatus*. Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy  $T_2^*$  wyznaczone z równań (126)

### *L. glabrirostris*

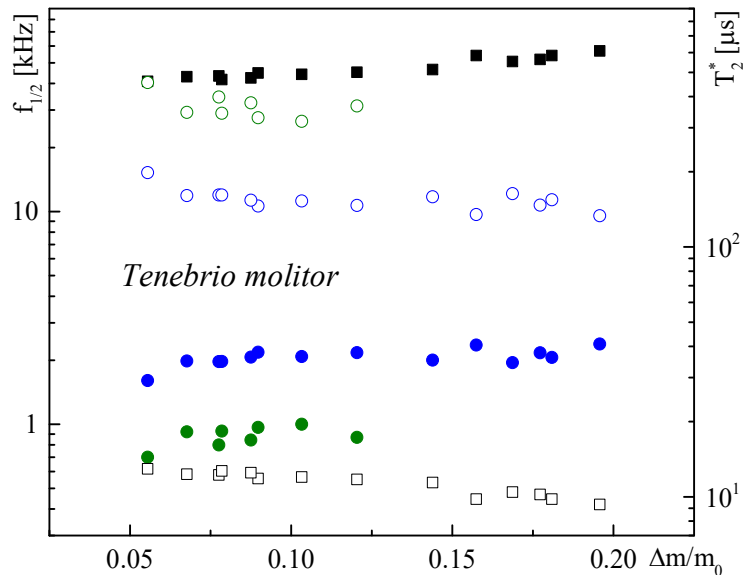
Dla poziomów uwodnienia pokryw poniżej  $\Delta m/m_0 = 0.1$  możliwe było rozróżnienie sygnału od wody ściśle i luźno związanej do powierzchni matrycy stałej. Pierwsza z nich dawała wąską linię o szerokości połówkowej w zakresie 0.9-2 kHz, podczas gdy woda luźno związana dawała linię o szerokości 2-5.3 kHz. Powyżej poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.1$  widoczna była tylko jedna linia, która stopniowo zwężała się z hydratacją pokryw od poziomu 2.5 kHz do 1.2 kHz.



Rysunek 45 Zależność hydratacyjna szerokości połówkowych linii Gaussa (■) oraz Lorentza (•,•) dla pokryw *L. glabrirostris*. Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy  $T_2^*$  wyznaczone z równań (126)

### *T. molitor*

Dla poziomów uwodnienia pokryw poniżej  $\Delta m/m_0 = 0.125$  możliwe było rozróżnienie sygnału od wody ściśle i luźno związanej do powierzchni matrycy stałej. Pierwsza z nich dawała wąską linię o szerokości połówkowej w zakresie 0.7-1 kHz, podczas gdy woda luźno związana dawała linię o szerokości 1.5-2.5 kHz. Powyżej poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.125$  widoczna była tylko jedna linia o szerokości ok. 2.5 kHz.



Rysunek 46 Zależność hydratacyjna szerokości połówkowych linii Gaussa (■) oraz Lorentza (•,•) dla pokryw *T. molitor*. Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy  $T_2^*$  wyznaczone z równań (126)



## 7.5 Pomiary zależności temperaturowych widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw *Donus comatus*, *Liparus glabrirostris* oraz *Tenebrio molitor*

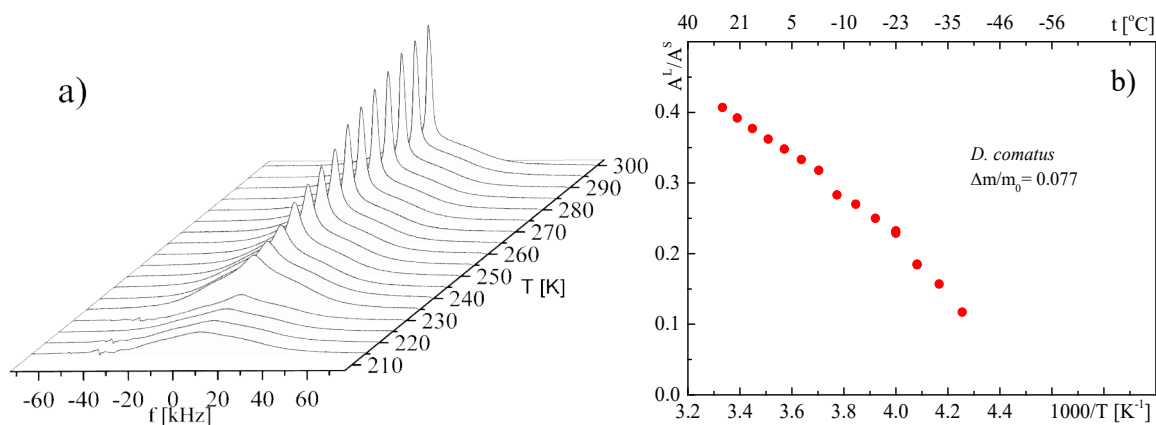
Dla pokryw o dwóch różnych poziomach uwodnienia zmierzono widma  $^1\text{H-NMR}$  w funkcji temperatury, w celu analizy zachowania wody związanej wewnątrz pokrywy. Cykl pomiarowy rozpoczynano w temperaturze pokojowej, a następnie próbkę ochładzano do około 220 K. Amplituda oraz pole pod wąską składową linią, którą można powiązać ze składową cieczową próbki spadały wraz z malejącą temperaturą. Sygnał cieczowy nie zanikał jednak w temperaturze równowagowego zamarzania wody, w 273 K, natomiast dla wszystkich próbek był on możliwy do zaobserwowania nawet w temperaturach ok. 240 K. Nie wykazano skokowej zmiany stosunku  $A^L/A^S$ , co sugeruje, że przechłodzona woda zawarta w matrycy stałej pokrywy wraz z obniżaną temperaturą stopniowo stawała się coraz mniej mobilna, lecz nie uległa procesowi kooperatywnego zamarzania, formowania krystalitu lodu. Podobnie zachowywała się woda związana w matrycy stałej pokryw wszystkich trzech badanych gatunków chrząszczy.

### *Donus comatus*

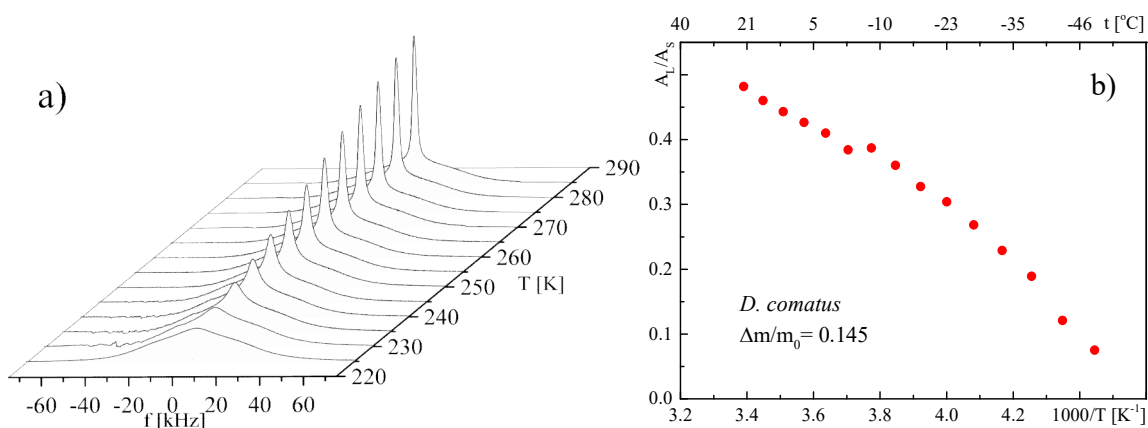
Dla pokryw *D. comatus* o niskim poziomie uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.077$ ) widma  $^1\text{H-NMR}$  w całym zakresie badanych temperatur można było skutecznie przybliżyć jako złożenia jednej linii gaussowskiej i jednej linii lorentzowskiej. Sygnał pochodzący od protonów mobilnych przestał być widoczny w ok. 230 K. Dla temperatur niższych, widmo dopasowywano jedynie funkcją Gaussa. Dla pokryw *D. comatus* o poziomie uwodnienia dwukrotnie wyższym ( $\Delta m/m_0 = 0.145$ ) sygnał od protonów mobilnych przestano rejestrować w zbliżonej temperaturze (ok. 225 K).

Dla hydratacji na poziomie  $\Delta m/m_0 = 0.077$  szerokość połówkowa dopasowanej linii Lorentza zmniejszała się z malejącą temperaturą w sposób ciągły od wartości 2.5 do 9 kHz, co zgodnie z wzorem (126) przekłada się na zmianę czasu  $T_2^*$  od 130  $\mu\text{s}$  w temperaturze pokojowej do 35  $\mu\text{s}$  w 235 K. Dla dwukrotnie wyższego poziomu uwodnienia pokryw linia cieczowa była widoczna jeszcze w 230 K i podczas ochładzania poszerzała się od 2.2 do 13 kHz. Odpowiada to znacznemu przyspieszeniu efektywnej relaksacji poprzecznej – czas  $T_2^*$  skrócił się z wartości 141 do 24  $\mu\text{s}$ .

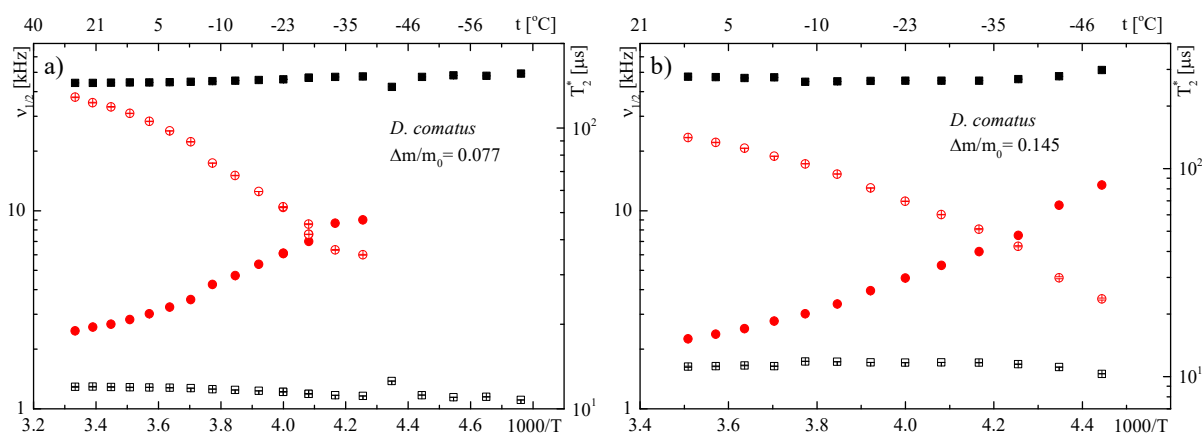
Szerokość połówkowa linii Gaussa opisującej sygnał pochodzący od ciała stałego zmienia się z malejącą temperaturą od 44 do 49 kHz dla pokryw o niższym poziomie uwodnienia i od 47 do 51 kHz dla wyższej hydratacji materiału. Odpowiada to skróceniu czasu  $T_2^*$  odpowiednio z 12 do 10.5 oraz z 11 do 10  $\mu$ s.



Rysunek 47 Zależność temperaturowa widm <sup>1</sup>H-NMR dla pokryw *D. comatus* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.077$ : a) zarejestrowane widma b) stosunek sygnału pochodzącego od protonów ciecży do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego  $A^L/A^S$



Rysunek 48 Zależność temperaturowa widm <sup>1</sup>H-NMR dla pokryw *D. comatus* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.145$ : a) zarejestrowane widma b) stosunek sygnału pochodzącego od protonów ciecży do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego  $A^L/A^S$

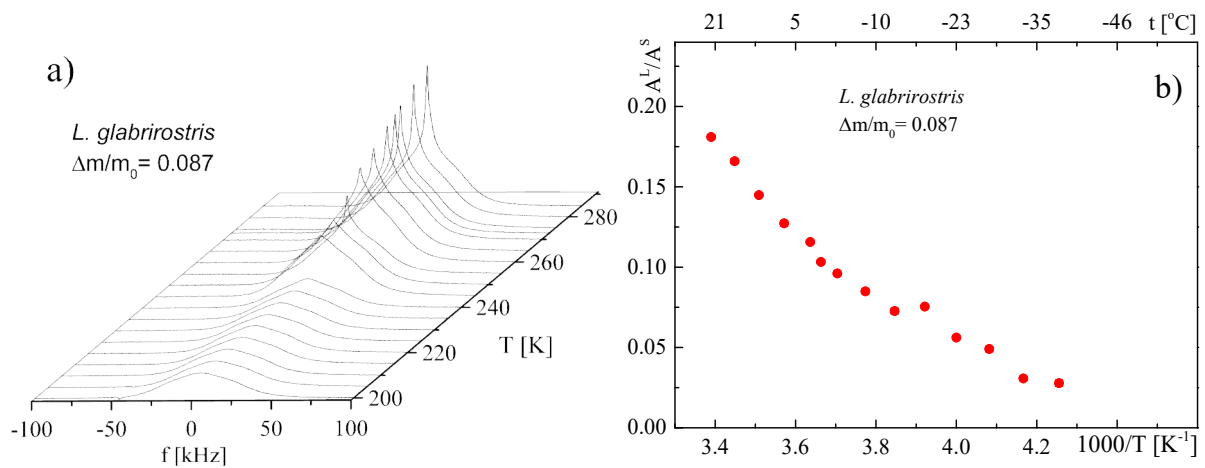


Rysunek 49 Zależność temperaturowa szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•) dla pokryw *D. comatus*. Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy  $T_2^*$  wyznaczone z równań (126)

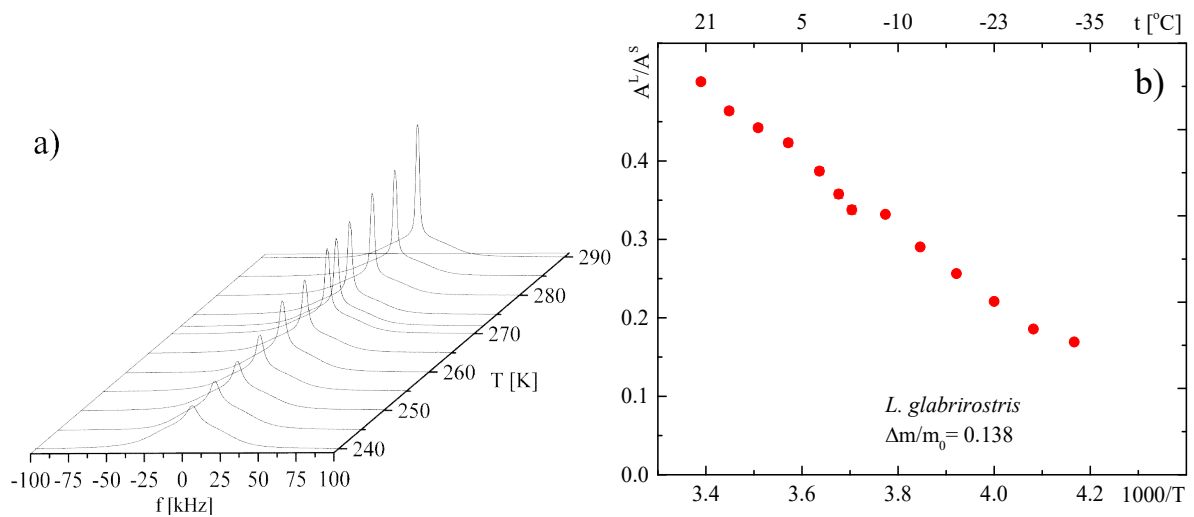
### *Liparus glabrirostris*

Dla pokryw gatunku *L. glabrirostris* o niskim poziomie uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.087$ ) widma  $^1\text{H-NMR}$  zostały przedstawione jako superpozycje jednej linii gaussowskiej i jednej linii lorentzowskiej. Szerokość połówkowa dopasowanej linii Lorentza zmniejszała się z malejącą temperaturą w sposób ciągły od wartości 2.5 do 9 kHz, co zgodnie ze wzorem (126) przekłada się na zmianę czasu  $T_2^*$  od 130  $\mu\text{s}$  w temperaturze pokojowej do 35  $\mu\text{s}$  w 235 K. Sygnał pochodzący od cieczy przestał być widoczny w temperaturze około 235 K, poniżej zaś tej temperatury w widmie udało się wyodrębnić jedynie pojedynczą funkcję Gaussa. Dla dwukrotnie bardziej uwodnionego materiału ( $\Delta m/m_0 = 0.138$ ) sygnał od wody stał się nieregistrowalny w nieco wyższej temperaturze (ok. 240 K). Linia cieczowa zwięzła się od wartości 1.9 kHz do 8 kHz (co odpowiada zmianie czasu  $T_2^*$  od 163 do 39  $\mu\text{s}$ ).

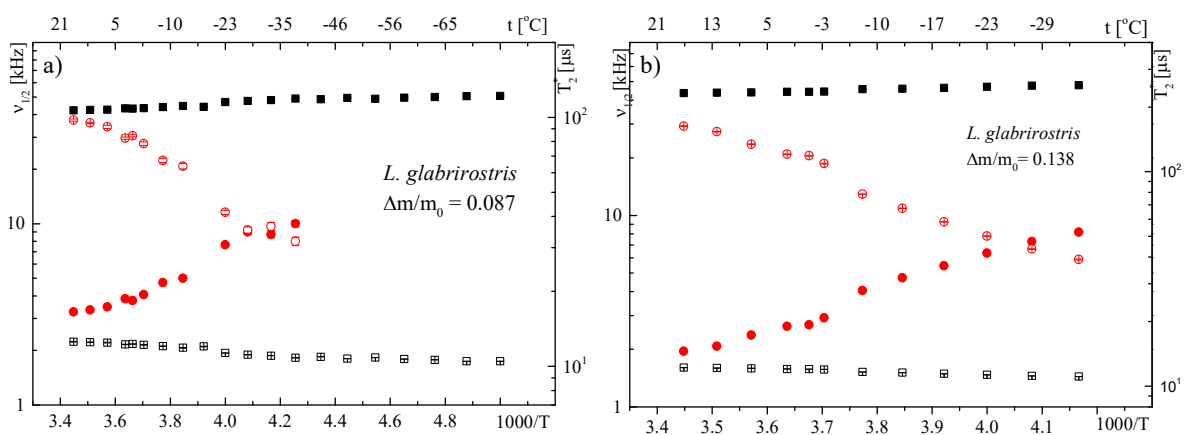
Linia Gaussa dopasowana do sygnału pochodzącego od ciała stałego zmieniała się w zakresie od 42 do 50 kHz, co oznacza, że czas  $T_{2G}^*$  miał wartość 12-10  $\mu\text{s}$ .



Rysunek 50 Zależność temperaturowa widm  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *L. glabrirostris* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.087$ : a) zarejestrowane widma b) stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego  $A^L/A^S$



Rysunek 51 Zależność temperaturowa widm  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *L. glabrirostris* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.138$ : a) zarejestrowane widma b) Stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego  $A^L/A^S$

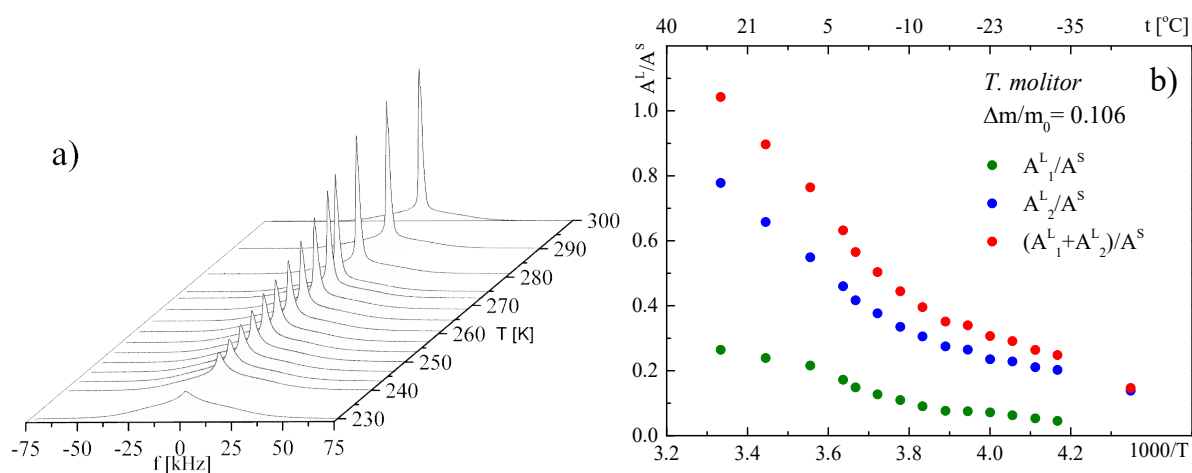


Rysunek 52 Zależność temperaturowa szerokości połówkowych linii Gaussa (■) oraz Lorentza (●) dla pokryw *L. glabrirostris*. Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy  $T_2^*$  wyznaczone z równań (126)

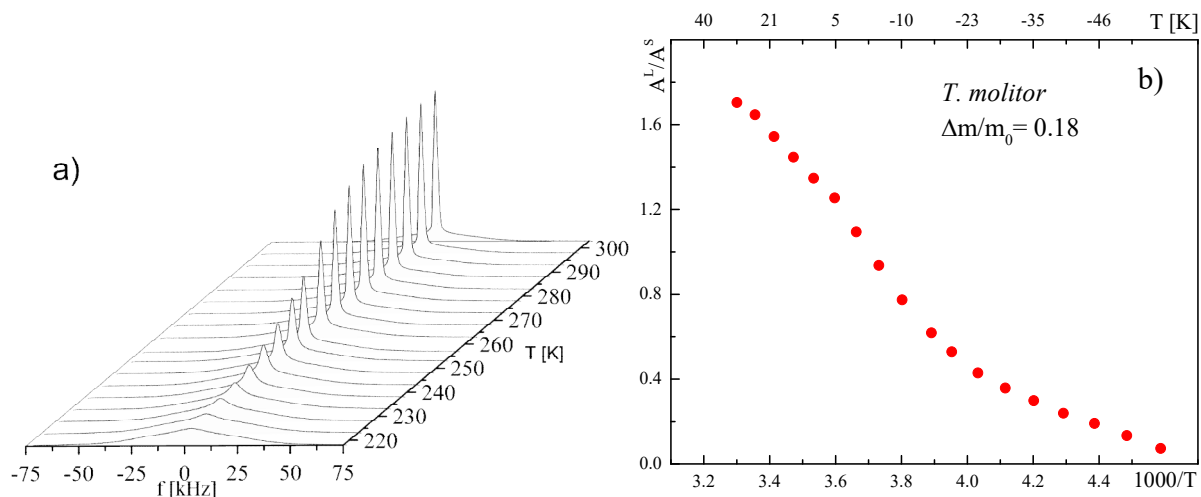
## *Tenebrio molitor*

Zależności temperaturowe widm  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw czarnuchowatego *T. molitor* pokazały inny obraz niż zaobserwowany opisanych wcześniej gatunkach Curculionidae. Otóż, w pokrywach gatunku *T. molitor* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.106$  wyodrębniono dwie frakcje bardziej mobilnych protonów. Ich linie dopasowano funkcjami Lorentza o szerokościach połówkowych w zakresach 0.7-2.4 kHz i 1.9-9 kHz. Odpowiada to zmianie czasu  $T_2^*$  od 460 i 170  $\mu\text{s}$  w temperaturze pokojowej do 130 i 35  $\mu\text{s}$  w 235 K. Linie te mogą charakteryzować frakcję wody ściśle związanej,  $L_1$ , oraz frakcję wody luźno związanej,  $L_2$ , różniące się odległością od powierzchni tkanki pokrywy. Może jednak wynikać to też z obecności w matrycy stałej pokrywy kawern o większych oraz o mniejszych rozmiarach, każda zawierająca obie frakcje wody związanej, lecz w różnej proporcji.

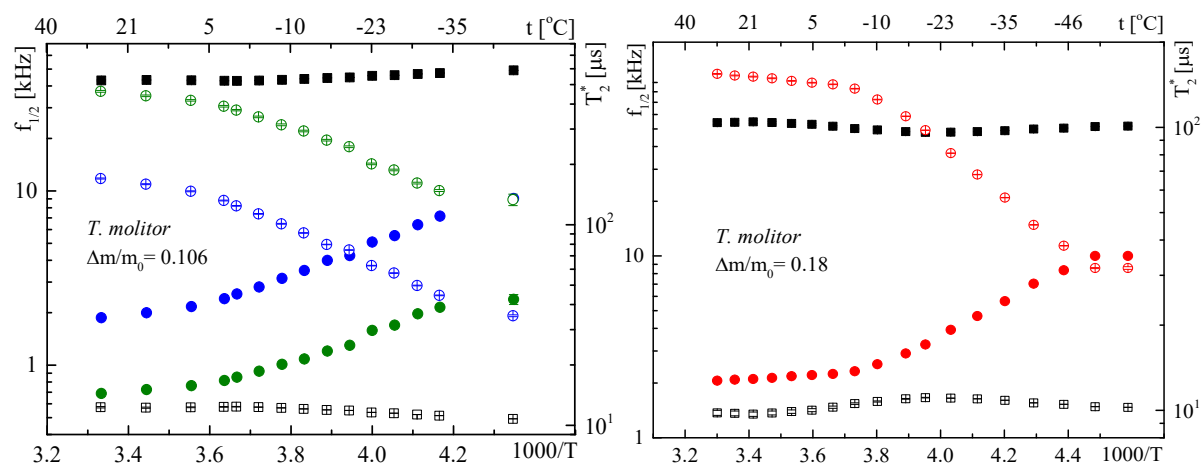
Dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.18$  pokryw widoczna była tylko jedna linia cieczowa, jaka zwężała się od wartości 2 kHz do 10 kHz (co odpowiada zmianie czasu  $T_2^*$  od 153 do 32  $\mu\text{s}$ ). Linia Gaussa dopasowana do sygnału pochodzącego od ciała stałego zmieniła się w zakresie od 48 do 53 kHz, co oznacza, że efektywny czas relaksacji poprzecznej wynosił 10-11  $\mu\text{s}$ .



Rysunek 53 Zależność temperaturowa widm  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *T. molitor* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.106$ : a) zarejestrowane widma b) Stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego  $A^L/A^S$



Rysunek 54 Zależność temperaturowa widm  $^1\text{H}$ -NMR dla pokryw *T. molitor* uwodnionych do  $\Delta m/m_0 = 0.18$ : a) zarejestrowane widma b) Stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego  $A^L/A^S$



Rysunek 55 Zależność temperaturowa szerokości połówkowych linii Gaussa ( $\blacksquare$ ) oraz Lorentza ( $\bullet, \circ, \circ$ ) dla pokryw *T. molitor*. Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy  $T_2^*$  wyznaczone z równań (126)

## 7.6 Pomiary spektroskopii relaksacyjnej $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw *Donus comatus*, *Liparus glabrirostris* oraz *Tenebrio molitor*

### 7.6.1 Czas relaksacji podłużnej $T_1$

Przeprowadzony za pomocą sekwencji IR eksperyment spektroskopii relaksacyjnej dla pokryw *D. comatus*, *L. glabrirostris* oraz *T. molitor*, pozwolił wyznaczyć niezależnie wartości czasów relaksacji  $T_1$  dla każdej z linii widma  $^1\text{H-NMR}$ . Podobnie jak w poprzednich rozdziałach, 7.3-7.5, do każdego z widm dopasowano superpozycję funkcji Gaussa oraz jednej lub dwóch funkcji Lorentza. Ich pola w funkcji czasu  $\tau$  przedstawiają odrost magnetyzacji podłużnej zgodnie z równaniem (88). Do otrzymanej funkcji relaksacji podłużnej dopasowywano funkcję eksponencjalną lub bieksponecjonalną postaci:

$$A(t) = A_\infty \left( 2 - e^{-\frac{t}{T_1^{L/S}}} \right), \quad (127)$$

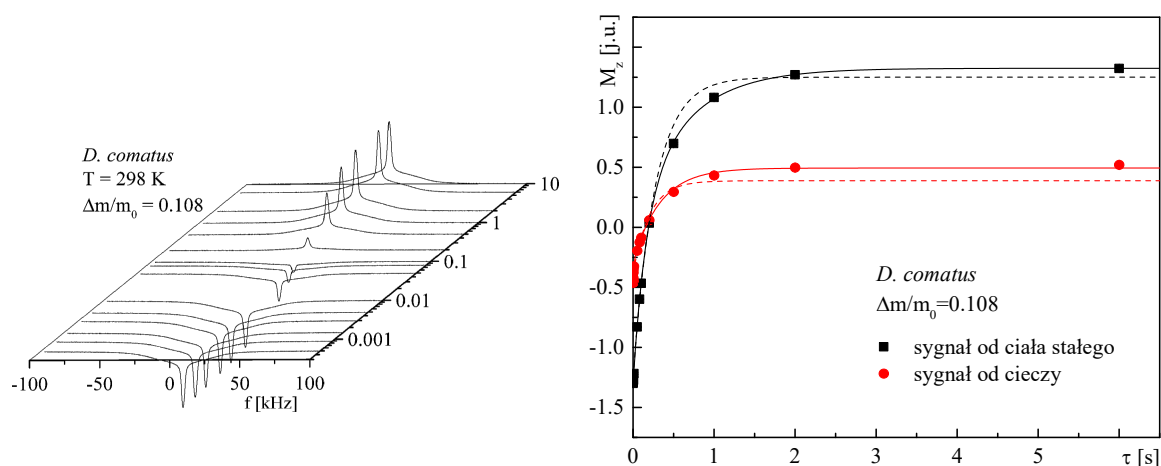
$$A(t) = A_\infty \left( 2 - C e^{-\frac{t}{T_{11}^{L/S}}} - (1 - C) e^{-\frac{t}{T_{12}^{L/S}}} \right). \quad (128)$$

Czasy relaksacji podłużnej zmierzone metodą spektroskopii relaksacyjnej w funkcji temperatury próbki zachowują się zgodnie z teorią BPP, jednak w części przypadków nie udało się zarejestrować minimum rozkładu temperaturowego  $T_1$  w funkcji  $1000/T$ , a jedynie jego część prawostronną. W takim przypadku, zamiast pełnego modelu BPP do zmierzonej zależności czasów relaksacji spinowo-sieciowej  $T_1$  dopasowano funkcję (95).

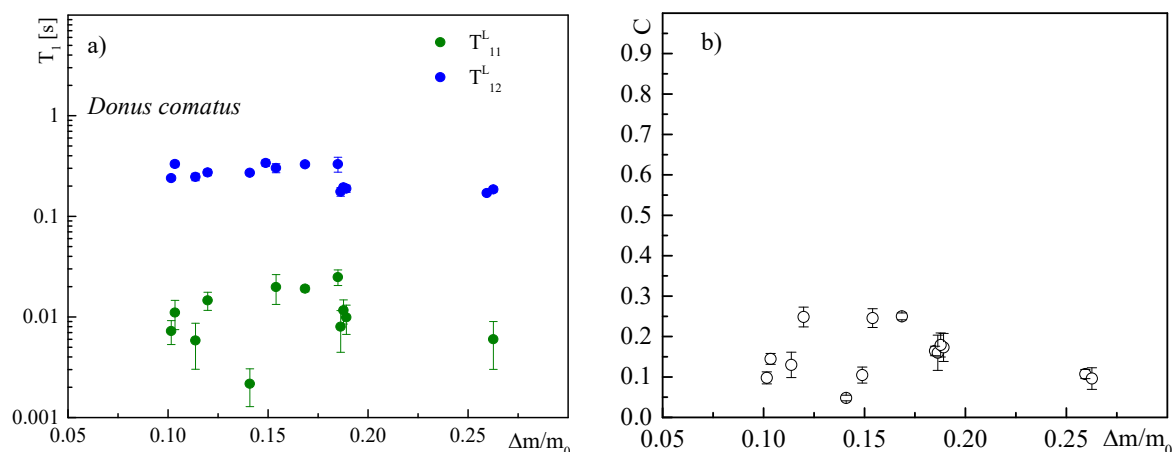
#### *Donus comatus*

Podczas eksperymentów IR w funkcji poziomu uwodnienia nie rozdzielono dwóch linii cieczowych w pokrywach *D. comatus*, jednak odrost magnetyzacji dla jedynej dopasowanej linii Lorentza jest wyraźnie bieksponecjalny (patrz Rys. 56). Może być to efekt nałożenia się na siebie sygnału pochodzącego od dwóch składowych cieczowych, jak również wynikać z transferu magnetyzacji między protonami cieczowymi i protonami matrycy stałej. Porównanie wartości względnych udziałów eksponent  $C/(1-C)$  ( $\approx 0.05-0.33$ ) ze stosunkiem pól pod liniami cieczowymi ( $A^L_1/A^L_2 = (A^L_1/A^S)/(A^L_2/A^S) \approx 0.3-0.5$ , patrz Rys. 41) wskazuje na to, że nie można interpretować tych eksponent jako odrostów magnetyzacji dwóch składowych: wody luźno i ściśle związanej. Tezę o transferze magnetyzacji w obrębie pokryw

potwierdza dwueksponencjalność odrostu magnetyzacji dla matrycy stałej (patrz Rys. 56). Problem ten zostanie szerzej przedyskutowany w rozdziale 7.7.1.



Rysunek 56 Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *D. comatus* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0=0.108$ , wykonany w temperaturze pokojowej; a) rodzina widm w funkcji odstępu  $\tau$  między impulsami  $\pi$  oraz  $\pi/2$ ; b) funkcja relaksacji podłużnej dla linii pochodzącej od ciała stałego i linii od cieczonej składowej widma; linia przerywana - dopasowanie jednoeksponencjalne, linia ciągła - dopasowanie dwueksponencjalne



Rysunek 57 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji podłużnej dla pokryw *D. comatus*: a) czasy relaksacji spin-sieć dla składowej cieczonej wyznaczone z dopasowania dwueksponencjalnego, b) udział składowej cieczonej o czasie  $T_{11}^L$  (parametr  $C$  z równania (128))

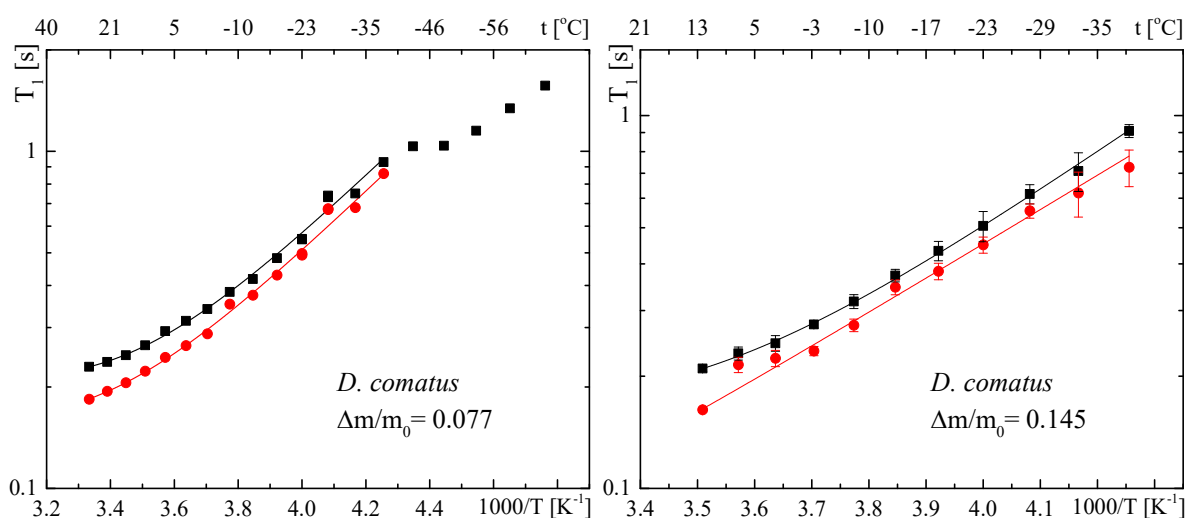
W eksperymentach spektroskopii relaksacyjnej przeprowadzanych w funkcji obniżanej temperatury, podobnie jak w eksperymencie przeprowadzonym w funkcji hydratacji, widma  $^1\text{H-NMR}$  od pokryw *D. comatus* dopasowano jako superpozycję jednej linii Gaussa i jednej linii Lorentza. Niestety nie udało się spójnie rozdzielić odrostów magnetyzacji sygnału cieczonego na dwie funkcje eksponencjalne, wskutek czego zostały one opisane jedną uśrednioną funkcją jednoeksponencjalną (127).

Po dopasowaniu zależności  $T_1(1000/T)$  wynikającej z równania BPP (patrz równanie (93)) dla poziomu uwodnienia pokryw  $\Delta m/m_0 = 0.077$  otrzymano wartość energii aktywacji równą  $E = 17.49 \pm 0.89\text{ kJ/mol}$  dla frakcji stałej oraz  $E = 17.53 \pm 0.82\text{ kJ/mol}$  dla frakcji



cieczowej, co w obu przypadkach jest wartością zbliżoną do energii pojedynczego wiązania wodorowego (Bruni & Leopolo 1992). Średnia odległość między oddziałującymi jądrami składowej stałej wyniosła 1.75 Å, zaś dla składowej cieczowej - 1.67 Å, co w przybliżeniu może zarówno odpowiadać odległości między parą wodorów w molekułe wody, jak i w grupie CH<sub>2</sub>.

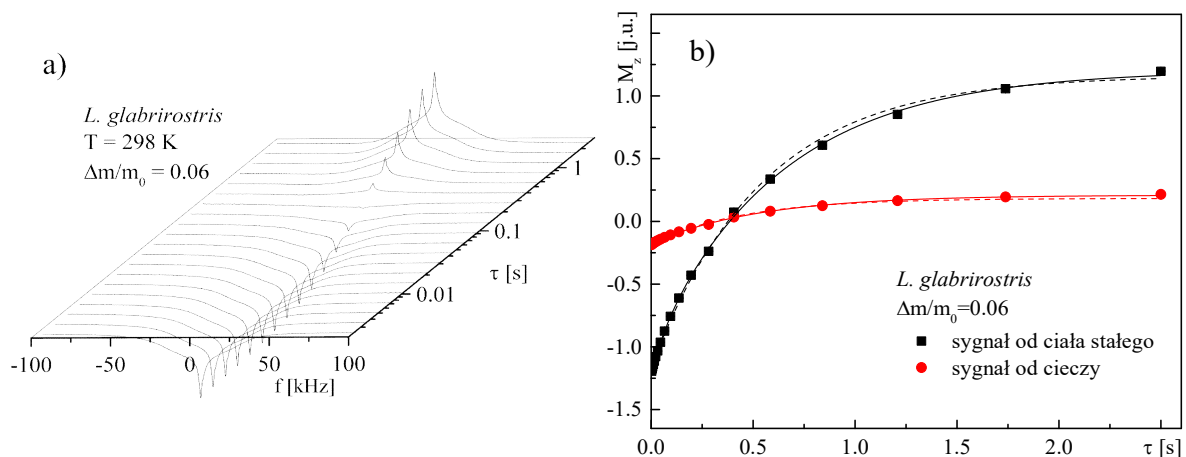
Dla pokrywy *D. comatus* podwyższonego poziomu uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.145$ ) uzyskano zbliżone wartości energii aktywacji, jak dla hydratacji  $\Delta m/m_0 = 0.077$ , jednakże bez widocznego minimum zależności  $T_1(1000/T)$  nie udało się wyznaczyć średniej odległości między relaksującymi protonami. Energia aktywacji dla frakcji stałej wynosi  $E = 20.16 \pm 0.35$  kJ/mol oraz  $E = 17.7 \pm 2.0$  kJ/mol dla frakcji cieczowej.



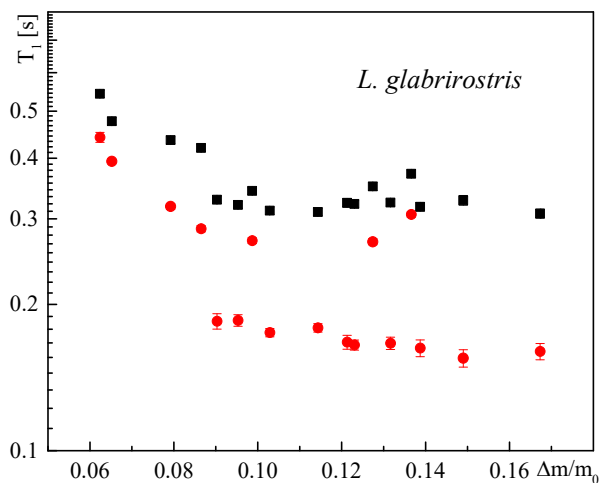
Rysunek 58 Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej  $T_1$  dla pokryw *Donus comatus*; kwadraty - składowa stała, kółka – składowa cieczowa, linie ciągłe - dopasowania funkcji (93) lub (95) (patrz rozdz. 5.4.6)

### *Liparus glabrirostris*

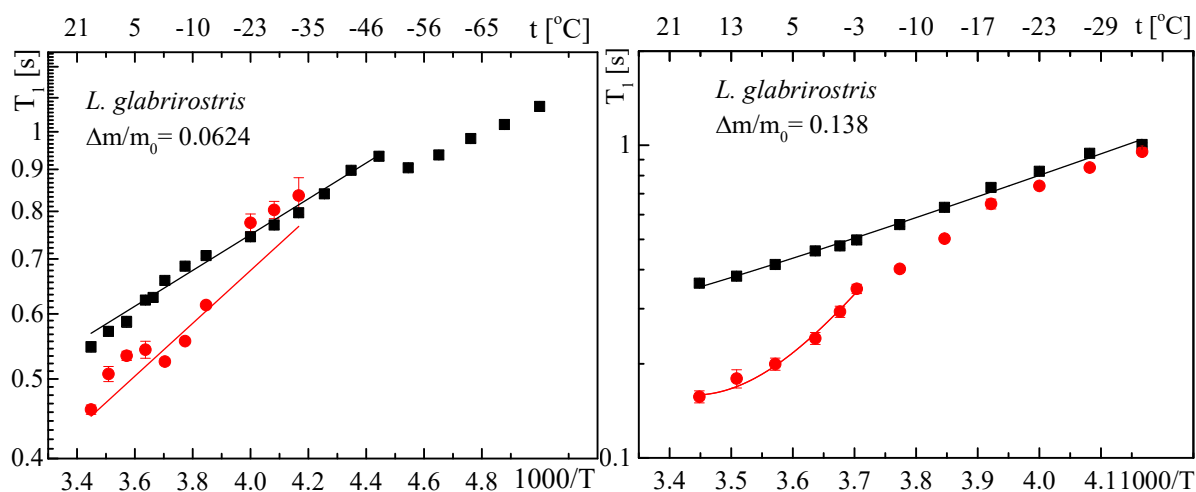
Dla widm zmierzonych w eksperymentach spektroskopii relaksacyjnej <sup>1</sup>H-NMR wykonanych w funkcji uwodnienia pokryw *L. glabrirostris* nie udało się wyodrębnić dwóch składowych cieczowych, podobnie jak to się zdarzyło w przypadku rejestracji pojedynczych widm. Relaksacja spinowo-spinowa może być dobrze opisana funkcją jednoeksponencjalną (patrz Rys. 59), co wskazuje na to, że dwie pule wody omówione w poprzednim rozdziale charakteryzują się bardzo podobnym czasem relaksacji podłużnej.



Rysunek 59 Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej  $^1\text{H-NMR}$  dla pokryw *L. glabrirostris* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0=0.087$ , wykonany w temperaturze pokojowej; (a) rodzina widm w funkcji odstępu  $\tau$  między impulsami  $\pi$  oraz  $\pi/2$ ; (b) funkcja relaksacji podłużnej dla linii pochodzącej od ciała stałego i linii od ciekowej składowej widma; linia przerywana - dopasowanie jednoeksponencjalne, linia ciągła - dopasowanie dwueksponencjalne



Rysunek 60 Zależność hydracyjna czasów relaksacji spinowo-sieciowej  $T_1$  dla składowej stałej (■) oraz ciekowej (●) dla pokryw *L. glabrirostris*

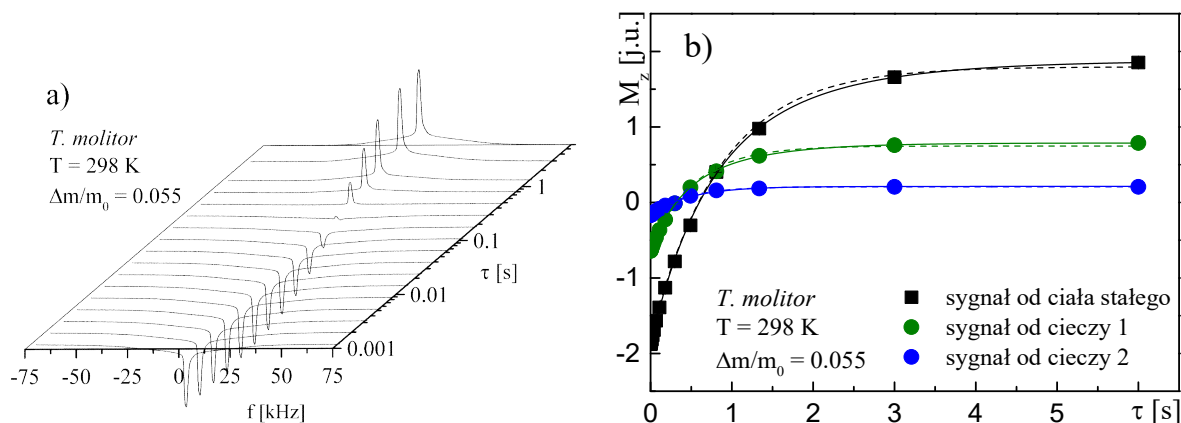


Rysunek 61 Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej  $T_1$  dla pokryw *Liparus glabrirostris*; kwadraty - składowa stała, kółka – składowa cieczowa, linie ciągłe - dopasowania funkcji (93) lub (95) (patrz rozdz. 5.4.6)

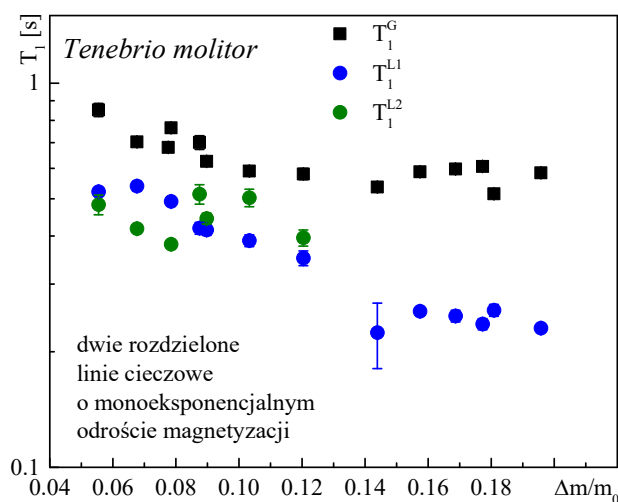
Dla pokryw *L. glabrirostris* o poziomie uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.0624$  udało się określić czas relaksacji podłużnej składowej cieczowej w zakresie  $-37$ – $21^\circ\text{C}$  (patrz Rys. 61). Po dopasowaniu modelu BPP do czasów  $T_1$  otrzymano wartość energii aktywacji równą  $E = 4.17 \pm 0.15$  kJ/mol dla frakcji stałej oraz  $E = 6.16 \pm 0.97$  kJ/mol dla frakcji cieczowej. Dla próbki pokryw uwodnionych do poziomemu  $\Delta m/m_0 = 0.138$  wyodrębniono jedną składową cieczową o wysokiej mobilności. Energia aktywacji dla frakcji stałej została określona jako  $E = 13.54 \pm 0.98$  kJ/mol, natomiast dla frakcji cieczowej jako  $E = 47.36 \pm 4.2$  kJ/mol, czyli jest równa dwukrotności średniej energii wiązania wodorowego (Suresh & Naik 2000). Dopasowanie modelu BPP do zależności temperaturowej wyznaczonych czasów  $T_1$  dla obu składowych pozwoliło na wyznaczenie średniej odległości  $r$  między oddziałującymi jądrami składowej cieczowej, która wyniosła  $1.66 \text{ \AA}$ .

### *Tenebrio molitor*

Dzięki eksperymentom spektroskopii relaksacyjnej  $^1\text{H-NMR}$  w pokrywach *T. molitor* udało się wyróżnić dwie składowe cieczowe dla niższego poziomu uwodnienia (patrz Rys. 63) oraz jedną składową cieczową dla poziomów uwodnienia powyżej  $\Delta m/m_0 = 0.13$ . Składowa określona jako  $T_1^{L1}$  (na Rys. 64 oznaczona przez niebieskie punkty) charakteryzowała się szerszą linią (rzędu  $1.5$ – $2$  kHz), podczas gdy składowa  $T_1^{L2}$  (punkty zielone) – wąską linią o szerokości połówkowej równej ok.  $800$  Hz, trzeba jednak zauważyć, że wyznaczone wartości czasów relaksacji spinowo-sieciowej są zbliżone dla obu tych składowych. Może to sugerować inną lokalizację podukładów wody  $L_1$  i wody  $L_2$  w próbce pokryw *T. molitor*.



Rysunek 62 Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej  $^1\text{H}$ -NMR dla pokryw *T. molitor* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0=0.055$ , wykonany w temperaturze pokojowej; (a) rodzina widm w funkcji odstępu  $\tau$  między impulsami  $\pi$  oraz  $\pi/2$ ; (b) funkcja relaksacji podłużnej dla linii pochodzącej od ciała stałego i linii od cieczej składowej widma; linia przerywana - dopasowanie jednoeksponecjalne, linia ciągła - dopasowanie dwueksponecjalne

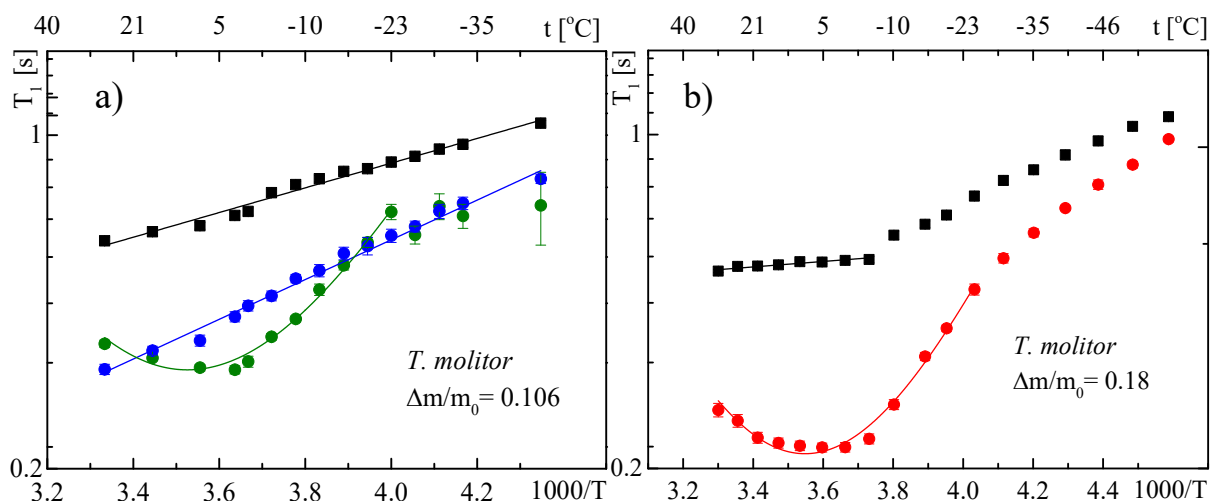


Rysunek 63 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji podłużnej składowej stałej (■) oraz cieczych (●, ●) dla pokryw *T. molitor*

Energia aktywacji składowej stałej dla poziomu hydratacji  $\Delta m/m_0 = 0.106$  wynosi  $E = (4.95 \pm 0.21)$  kJ/mol. W przypadku składowych pochodzących od cieczy wartości te wynoszą  $E = (7.97 \pm 0.18)$  kJ/mol dla jednej i  $E = (26.69 \pm 0.90)$  kJ/mol dla drugiej składowej. Wyraźnie różna energia aktywacji dla obu wyznaczonych składowych cieczych potwierdza tezę o przestrzennym rozdzieleniu podukładu wody związanej  $L_1$  i podukładu  $L_2$ . Dzięki rejestracji minimum rozkładu  $T_1(1000/T)$  określono średnią odległość między oddziałującymi protonami drugiej składowej cieczechowej na  $r = 1.86$  Å.

W przypadku próbki pokryw *T. molitor* o poziomie uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.18$  eksperyment spektroskopii relaksacyjnej  $^1\text{H}$ -NMR pokazał zbliżony obraz. Energia aktywacji składowej stałej wyznaczona z równania (95) wynosi jedynie  $E = (1.1 \pm 0.14)$  kJ/mol. Jedyna

zaobserwowana składowa cieczowa charakteryzuje się energią  $E = (26.86 \pm 0.79)$  kJ/mol i średnią odległością między parą relaksujących protonów równą  $r = 1.74$  Å, czyli wartościami zbliżonymi do uzyskanych dla pokryw innych badanych gatunków.



Rysunek 64 Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej  $T_1$  dla pokryw *Tenebrio molitor*; kwadraty - składowa stała, kółka – składowa cieczowa, linie ciągłe - dopasowania funkcji (93) lub (95) (patrz rozdz. 5.4.6)

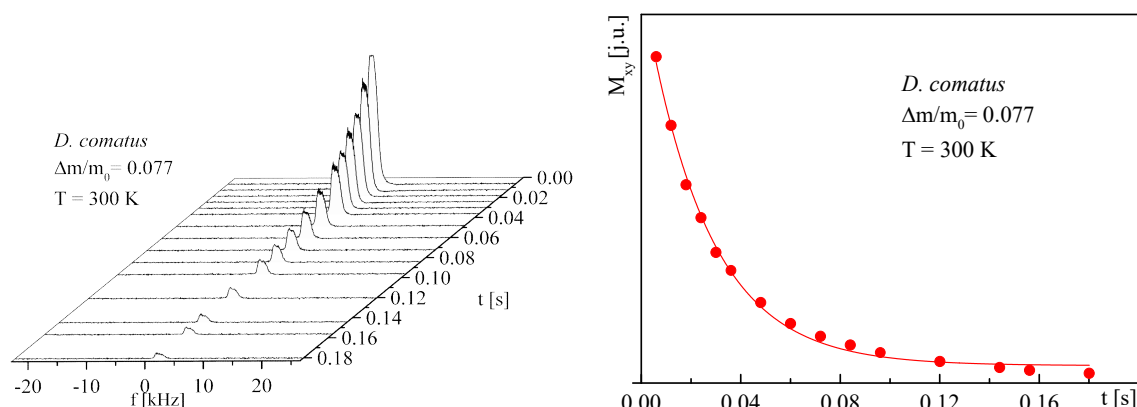
## 7.6.2 Czas relaksacji poprzecznej $T_2$

Wyznaczenie rzeczywistego czasu relaksacji poprzecznej  $T_2$  jest możliwe dzięki użyciu sekwencji Carra-Purcella-Meibooma-Gilla (CPMG), niestety skala czasowa takiego eksperymentu pozwala na obserwację wyłącznie składowej cieczonej. Pomiarów pokryw chrząszczy dokonano z czasem  $\tau = 1$  ms, co oznacza że czas między kolejnymi impulsami  $\pi$  wynosił ok. 2 ms (patrz równanie (114)), a więc zastosowana sekwencja CPMG umożliwiła obserwację wody luźno związanej, jaka charakteryzuje się względnie długim czasem  $T_2$ . Do przetransformowanych do domeny częstotliwości ech spinowych zarejestrowanych sekwencją CPMG dopasowano jedną lub dwie funkcje Lorentza. Pole pod linią zmienia się w czasie zgodnie z równaniem (88), więc zanik magnetyzacji poprzecznej opisano funkcją eksponencjalną:

$$M_{xy} = M_{xy}(0) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right). \quad (129)$$

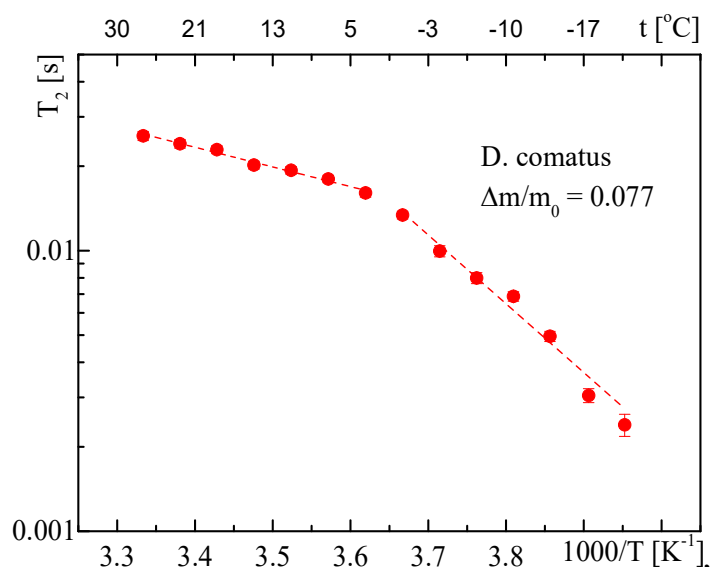
Początkowo do zależności temperaturowej czasu relaksacji spinowo-spinowej  $T_2$  dopasowano pełny model BPP (równanie (93)), który jednak nie odwzorował danych w satysfakcjonujący sposób, analogicznie do analizy czasu relaksacji spinowo-sieciowej (patrz rozdział 7.6.1) użyto więc liniowej postaci modelu BPP (równanie (97)) i dopasowano oddzielnie część wysoko- i niskotemperaturową. Podobne zachowanie, czyli zmiana energii aktywacji z temperaturą, zostało zaobserwowane dla wody przechłodzonej (Gillen i in. 1972; Price i in. 1999).

### *Donus comatus*



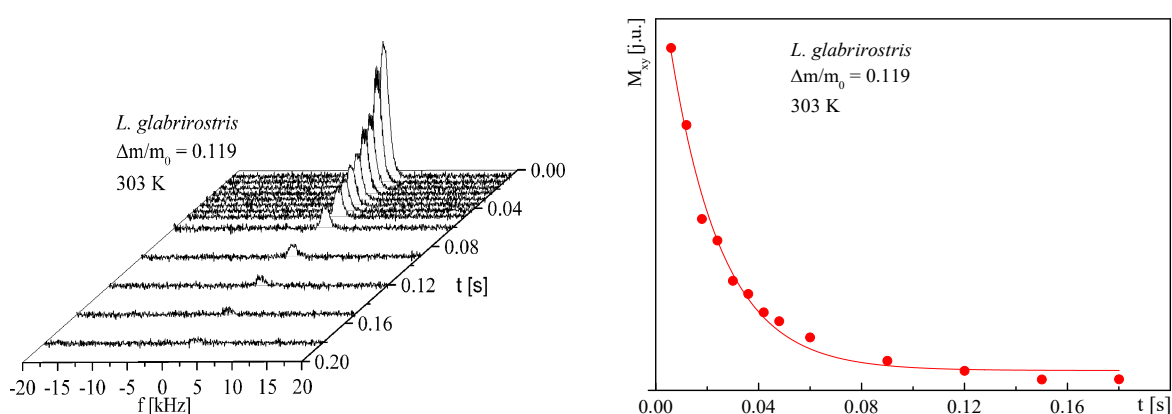
Rysunek 65 Zanik magnetyzacji poprzecznej składowej cieczonej dla pokryw *D. comatus* o  $\Delta m/m_0 = 0.077$ . Linia ciągła - dopasowanie funkcji (129)

W eksperymencie CPMG dla pokryw gatunku *D. comatus* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.077$  udało się wyodrębnić jedną składową cieczową. Pola pod dopasowanymi do nich liniami Lorentza są proporcjonalne do składowej poprzecznej magnetyzacji i zmniejszają się w czasie zgodnie z równaniem (129). Korzystając z zależności (97) uzyskano wartości energii aktywacji równe  $E_1 = (5.83 \pm 0.32)$  kJ/mol oraz  $E_2 = (20.36 \pm 1.44)$  kJ/mol odpowiednio dla części wysoko- i niskotemperaturowej.



Rysunek 66 Zależność temperaturowa czasu relaksacji poprzecznej  $T_2$  składowej cieczowej dla pokryw *D. comatus* o  $\Delta m/m_0 = 0.077$ . Linie przerywane – dopasowania funkcji (97)

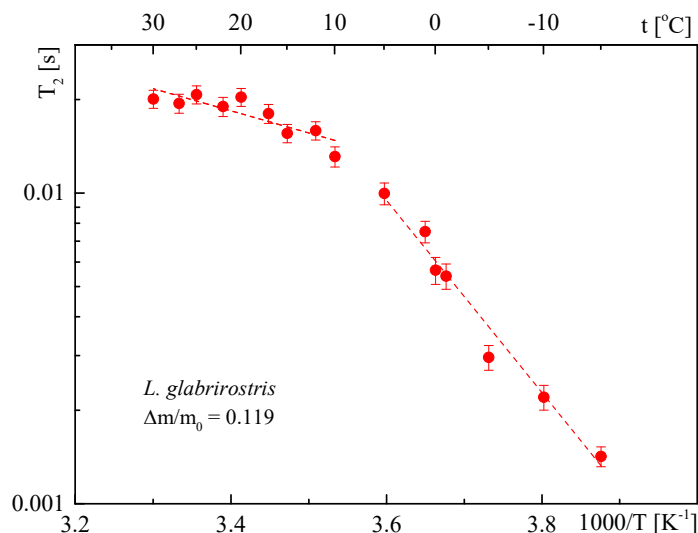
### *Liparus glabrirostris*



Rysunek 67 Zanik magnetyzacji poprzecznej składowej cieczowej dla pokryw *L. glabrirostris* o  $\Delta m/m_0 = 0.119$ . Linia ciągła - dopasowanie funkcji (129)

Dla pokryw gatunku *L. glabrirostris* widma zarejestrowane w eksperymencie CPMG również dały się skutecznie przybliżyć pojedynczą funkcją Lorentza. Po dopasowaniu funkcji BPP do zależności  $T_2(1000/T)$  dla poziomu uwodnienia pokryw  $\Delta m/m_0 = 0.119$  otrzymano

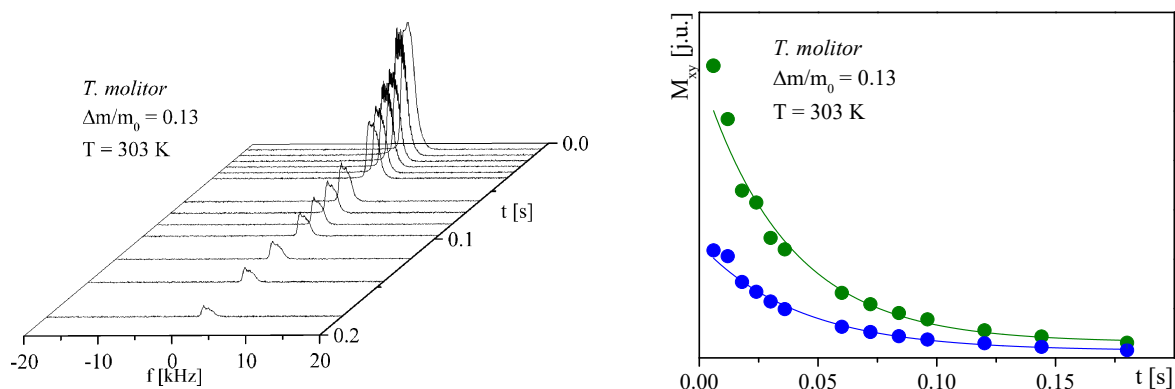
wartości energii aktywacji równe  $E_1 = (5.9 \pm 1.2)$  kJ/mol oraz  $E_2 = (25.7 \pm 1.7)$  kJ/mol, odpowiednio dla części wysoko- i niskotemperaturowej.



Rysunek 68 Zależność temperaturowa czasu relaksacji poprzecznej  $T_2$  składowej cieczowej dla pokryw *L. glabrirostris* o  $\Delta m/m_0 = 0.119$ . Linie przerywane – dopasowania funkcji (97)

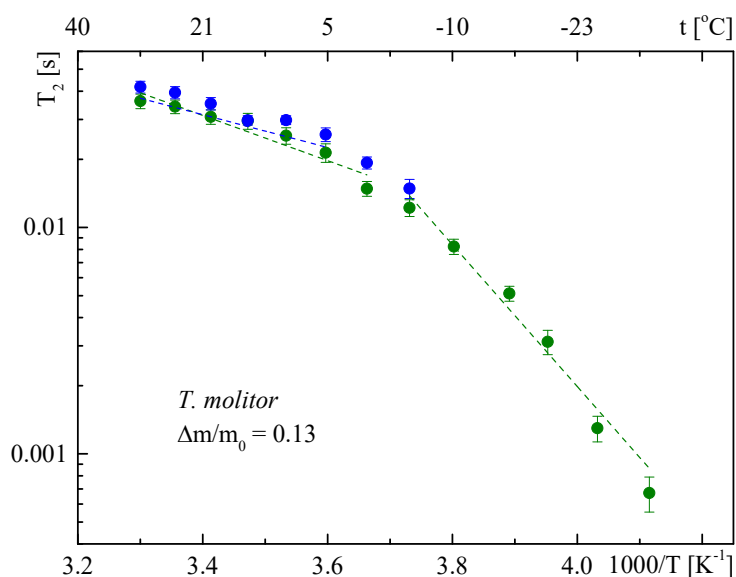
### *Tenebrio molitor*

W przypadku pokryw *T. molitor* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.13$  sygnał pochodzący od sygnału cieczowego był wyraźnie asymetryczny, co wskazywało na możliwość wyodrębnienia dwóch frakcji wody mobilnej. Dwie funkcje Lorentza konsystentnie opisywały widma aż do 268 K, dla niższych temperatur dopasowywano już tylko jedną linię. Energie aktywacji wyniosły  $(8.3 \pm 1.1)$  kJ/mol (dla wyższych temperatur) i  $(26.1 \pm 2.3)$  kJ/mol dla pierwszej składowej i  $(6.0 \pm 0.6)$  kJ/mol dla drugiej.



Rysunek 69 Zanik magnetyzacji poprzecznej składowych cieczowych dla pokryw *T. molitor* o  $\Delta m/m_0 = 0.13$ . Linie ciągłe - dopasowanie funkcji (129)





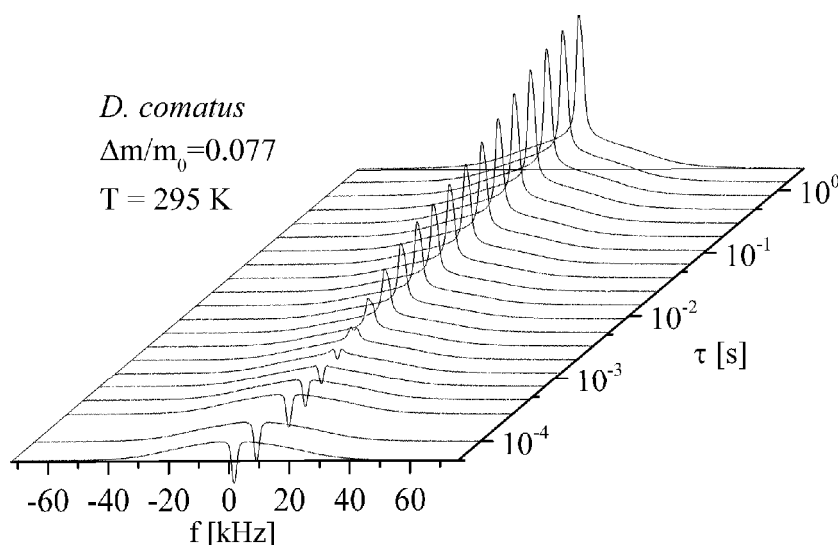
Rysunek 70 Zależność temperaturowa czasu relaksacji poprzecznej  $T_2$  składowych cieczowych dla pokryw *T. molitor* o  $\Delta m/m_0 = 0.13$ . Linie przerywane - dopasowanie funkcji (97)

## 7.7 Pomiar transferu magnetyzacji jądrowej

### 7.7.1 Obserwacja transferu magnetyzacji jądrowej pomiędzy różnymi podukładami protonów w pokrywach chrząszczy

Klasyczny eksperyment pomiaru procesu relaksacji podłużnej nie pozwala wyłowić efektu transferu magnetyzacji jądrowej pomiędzy podukładami spinowymi w układzie heterogennym, a który może mieć miejsce w trakcie procesu relaksacji. By zaobserwować proces transferu magnetyzacji pomiędzy podukładami protonów pokryw wybranych gatunków chrząszczy przeprowadzono pomiary selektywnego wzbudzenia. Zastosowano sekwencję  $\pi - \tau - \pi/2$ , w której impuls  $\pi$  był znacznie dłuższy niż zwykle, za to o niższej mocy. Wytworzone przezeń pole  $B_1$  nie przekraczało wartości pól lokalnych, a tym samym nie wystarczało do obrócenia spinów składowej stałej próbki (patrz podrozdział 5.5.1). Służący do detekcji sygnału impuls  $\pi/2$  pozostał „twardy”. Dzięki temu mimo, że dokonywano inwersji magnetyzacji pochodzącej tylko od bardziej mobilnych protonów (cieczowych), to metoda pozwala na zbadanie ewolucji w czasie zarówno sygnału pochodzącego od protonów cieczowych, jak i protonów matrycy stałej. Proces wymiany nakładał się na zachodzący w próbce proces relaksacji spinowo-sieciowej.

Na początku do serii zarejestrowanych widm zebranych dla różnych wartości odstępu między impulsami,  $\tau$ , dopasowano funkcje Gaussa oraz Lorentza, jakie modelowały sygnał pochodzący od ciała stałego i protonów ciekłych. Zmiana magnetyzacji w czasie została dla każdej ze składowych przetransformowana do postaci zredukowanej zgodnie z równaniem (98). Do takiego zestawu danych dopasowano układ równań opisujący zmianę tychże magnetyzacji w czasie (równanie (100)). Dopasowywane były następujące parametry: szybkości transferu  $k_1$ ,  $k_2$ , początkowe magnetyzacje  $m_1(0)$ ,  $m_2(0)$  oraz rzeczywiste, wewnętrzne czasy relaksacji  $T_{12}$  oraz  $T_{12}$ .

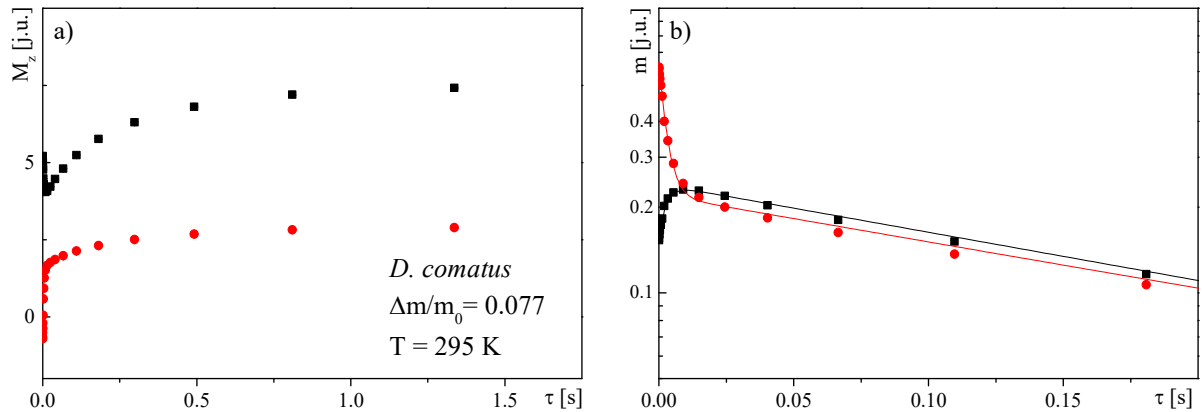


Rysunek 71 Przykładowa seria widm zarejestrowanych przy pomocy sekwencji selektywnego wzbudzenia dla pokryw *D. comatus*

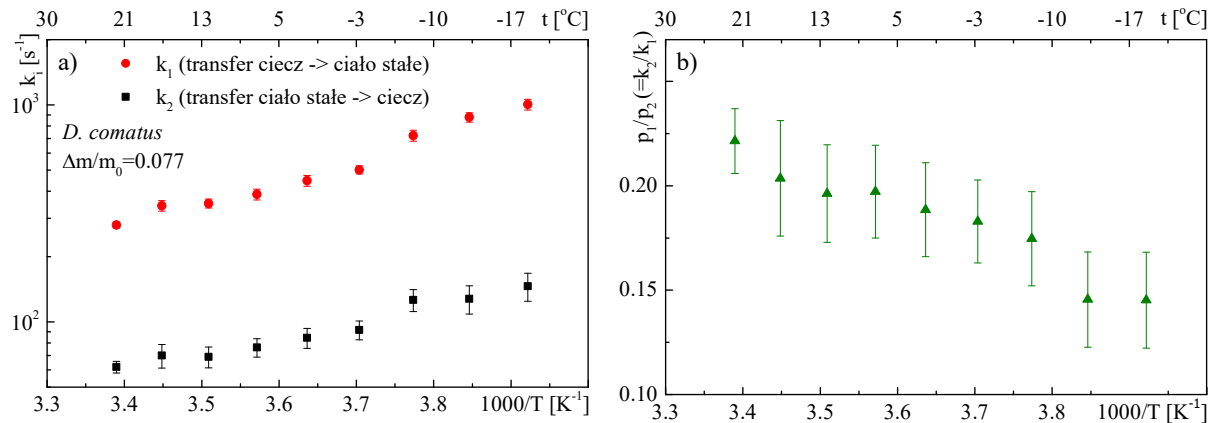
Dla pokryw gatunku *D. comatus* uwodnionych do poziomu 0.077 uzyskano szybkości transferu magnetyzacji rzędu  $k_1 = 280-1004 \text{ s}^{-1}$  ( $k_1$  zdefiniowano jako szybkość transferu od protonów ciekłych do protonów matrycy stałej) i  $62-146 \text{ s}^{-1}$  (szybkość transferu od protonów matrycy stałej do protonów ciekłych). Szybkości transferu zwiększały się monotonicznie z temperaturą. Stosunek liczby protonów ciekłych do protonów matrycy stałej biorących udział w transferze magnetyzacji (patrz równanie (102)) maleje wraz z temperaturą, jednak w zakresie mniejszym, niż wynika to z zależności  $A^L/A^S$ .

Eksperyment selektywnego wzbudzenia umożliwił wyznaczenie rzeczywistego, „wewnętrznego” czasu relaksacji podłużnej. Taki czas opisywałby proces relaksacji spin-sieć w sytuacji, gdyby nie dochodziło do wymiany magnetyzacji między różnymi pulami protonów. Na Rys. 74 przedstawiono porównanie rzeczywistego czasu  $T_1$  frakcji ciekłej w pokrywach *D. comatus* wyznaczonego w eksperymencie selektywnego wzbudzenia (przez dopasowanie

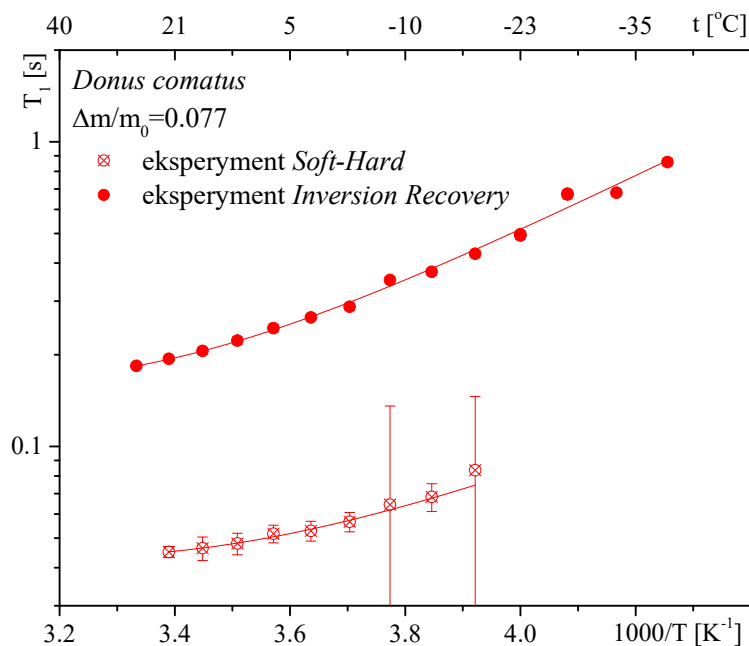
równania (100)) z czasem wyznaczonym w sekwencji *Inversion recovery* (patrz rozdział 7.6.1). Można zauważyć, że wartości rzeczywistego czasu relaksacji są w przybliżeniu mniejsze od czasu efektywnego o czynnik 5. Energia aktywacji wyznaczona z zależności temperaturowej rzeczywistego  $T_l$  frakcji ciekowej wynosi  $(14.1 \pm 1.5)$  kJ/mol, zaś średnia odległość między protonami -  $r_{HH} = (1.33 \pm 0.08)$  Å; obie te wielkości są nieznacznie mniejsze niż odpowiadające im wartości wyznaczone w eksperymencie *Inversion recovery*.



Rysunek 72 a) Zmiana magnetyzacji podłużnej w czasie dla składowej stałej (▪) i składowej ciekowej (•), b) zredukowana postać magnetyzacji (patrz równanie (98)) wraz z dopasowaniem funkcji (100)



Rysunek 73 a) Zależność temperaturowa szybkości transferu magnetyzacji, b) stosunek liczby protonów ciekowych do liczby protonów ciała stałego podlegających procesowi transferu magnetyzacji dla pokryw *D. comatus* uwodnionych do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.077$



Rysunek 74 Porównanie czasu relaksacji podłużnej wyznaczonego przy użyciu sekwencji *Inversion recovery* (patrz rozdział 7.6.1) oraz sekwencji *Soft-hard*. Linie ciągłe – dopasowania funkcji (93)

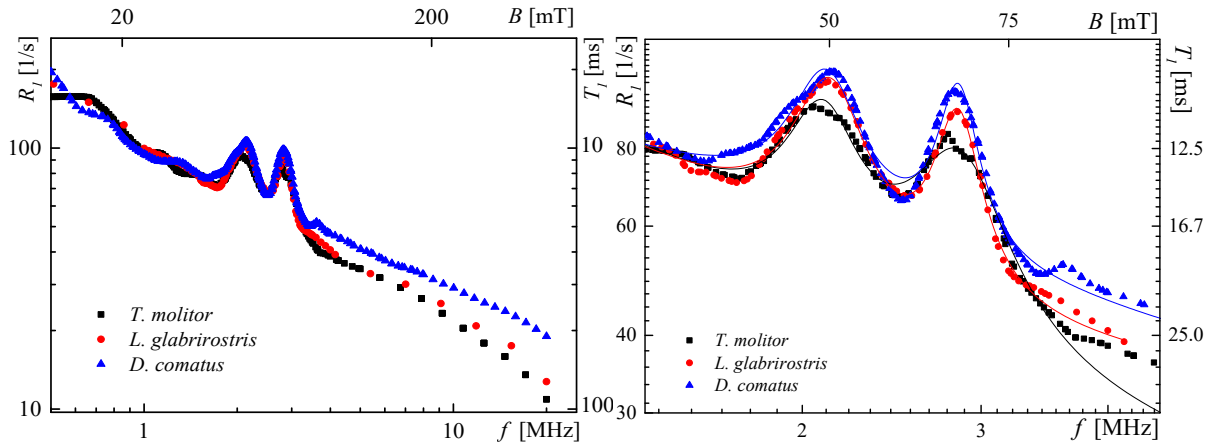
### 7.7.2 Obserwacja transferu $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$

Z równań (82) wynika, że w przypadku transferu magnetyzacji między jądrami  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  efekt skrócenia czasu relaksacji podłużnej (czyli wystąpienie lokalnych maksimów funkcji  $1/T_1(B)$ ) wystąpi dla częstotliwości larmorowskich równych:

$$\begin{aligned}
 f_+ &= \frac{a_{qcc}}{4} (3 + \eta) \\
 f_- &= \frac{a_{qcc}}{4} (3 - \eta) \\
 f_0 &= f_+ - f_-
 \end{aligned}
 \tag{130}$$

Na profilach dyspersji szybkości relaksacji zmierzonych dla pokryw każdego z gatunków można jednoznacznie zidentyfikować dwa maksima w obszarze 2-3 MHz (patrz Rys. 75). By oznaczyć ich dokładne położenie, a co za tym idzie - stałą sprzężenia kwadrupolowego i współczynnik asymetrii, dopasowano do danych doświadczalnych funkcję modelującą maksima (dwie funkcje Lorentza) wraz z tłem (dwie funkcje BPP (93)):

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} = & C_1 \left( \frac{\tau_1}{1 + (2\pi f)^2 \tau_1^2} + \frac{4\tau_1}{1 + 4(2\pi f)^2 \tau_1^2} \right) \\ & + C_2 \left( \frac{\tau_2}{1 + (2\pi f)^2 \tau_2^2} + \frac{4\tau_2}{1 + (2\pi f)^2 \tau_2^2} \right) + \frac{A_1 w_1}{4(f - f_{c1})^2 + w_1^2} \\ & + \frac{A_2 w_2}{4(f - f_{c2})^2 + w_2^2}. \end{aligned} \quad (131)$$



Rysunek 75 Profile dyspersyjne uzyskane metodą relaksometrii FC-NMR. Po prawej obszar z maksimumi kwadrupolowymi wraz z dopasowaniem funkcji (131)

Superpozycja takich czterech wyrazów wystarczyła, by w zadowalający sposób zamodelować kształt profilu dyspersji szybkości relaksacji podłużnej w układzie. Najważniejsze parametry dopasowania zostały zebrane w Tab. 7. Parametry powiązane z tłem nie będą dalej analizowane, gdyż zbyt wąski zakres pól, w których zmierzono relaksację, nie pozwala na wiarygodne odtworzenie wielkości mających znaczenie fizyczne. Widoczne jest jednak, że dla wszystkich trzech gatunków wartości stałej sprzężenia kwadrupolowego i parametru asymetrii są zbliżone, po uśrednieniu wynoszą odpowiednio:

$$\begin{aligned} a_{qcc} &= 3.305 \pm 0.004 \text{ MHz} \\ \eta &= 0.445 \pm 0.003 \end{aligned}$$

Trzecie maksimum powinno pojawić się dla częstotliwości larmorowskiej równej ok. 700 kHz, jednak jest ono wyraźnie czytelne jedynie dla pokryw *T. molitor* i *D. comatus*.

Tabela 7 Parametry dopasowania tła funkcji (131) do profilu NMRD (u góry) oraz położenia funkcji Lorentza wraz z odpowiadającymi im wartościami  $a_{qcc}$  i  $\eta$  (na dole)

	$C_1$ [Hz <sup>2</sup> ]	$C_2$ [Hz <sup>2</sup> ]	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]
<i>T. molitor</i>	$(68.5 \pm 3.8) \cdot 10^6$	$(347 \pm 4.2) \cdot 10^6$	$696 \pm 45$	$89.2 \pm 2.8$
<i>L. glabrirostris</i>	$(58.7 \pm 1.8) \cdot 10^6$	$(310 \pm 5.6) \cdot 10^6$	$1560 \pm 44$	$119 \pm 3$
<i>D. comatus</i>	$(9 \pm 594) \cdot 10^{10}$	$(25.8 \pm 2.3) \cdot 10^7$	$(1.5 \pm 100) \cdot 10^5$	$34.6 \pm 3.6$
	$f_{e1}$ [MHz]	$f_{e2}$ [MHz]	$a_{qcc}$ [MHz]	$\eta$
<i>T. molitor</i>	$2.847 \pm 0.014$	$2.0911 \pm 0.0091$	$3.292 \pm 0.015$	$0.459 \pm 0.013$
<i>L. glabrirostris</i>	$2.8446 \pm 0.0054$	$2.1237 \pm 0.0051$	$3.3122 \pm 0.0070$	$0.4353 \pm 0.0063$
<i>D. comatus</i>	$2.8474 \pm 0.0033$	$2.1073 \pm 0.0037$	$3.3031 \pm 0.0047$	$0.4481 \pm 0.0043$

## 8 Dyskusja wyników

Chityna, jak wszystkie polisacharydy, zawiera wiele grup hydroksylowych i silnie oddziałuje z wodą, jednak sorpcja na pokrywach skrzydłowych chrząszczy jest zagadnieniem trudnym do analizy ze względu na złożoność tkanki, zawierającej również inne substancje. Sorpcja wody z fazy gazowej ma charakter wielowarstwowy, jednakże najprostszy model sorpcji wielowarstwowej, izoterma BET, nie opisuje poprawnie tego zjawiska. Wprowadzenie dodatkowych parametrów do modelu pozwala na lepsze odwzorowanie danych doświadczalnych, lecz na podstawie zebranych danych niemożliwe jest jednoznaczne rozstrzygnięcie, który z analizowanych modeli dokładnie opisuje mechanizm sorpcji na powierzchniach pokryw badanych gatunków. Oszacowano powierzchnię dostępną dla molekuł wody na 169–172, 123 – 183, 172 – 260 m<sup>2</sup>/g odpowiednio dla pokryw *D. comatus*, *L. glabrirostris*, *T. molitor*. Zdjęcia mikrograficzne zdają się potwierdzać to, że pokrywy Mącznika młynarka mają największą powierzchnię właściwą – warstwy tworzące strukturę skręconej sklejkii mają najmniejszą grubość, ponadto stwierdzono obecność wydatnych spłaszczonych kolców na stronie brzusznej pokrywy, jakie znacznie zwiększają powierzchnię dostępną dla cząsteczek wody. Wartości powierzchni dostępnej dla wody wyznaczone dla wszystkich gatunków są zbliżone do tych otrzymanych dla innych heterogennych układów biologicznych: dla silnie schitynizowanego ciała raka *Procambarus clarkii* wynosi 118 m<sup>2</sup>/g (Ariahu i in. 2006), dla plechy grzyba zlichanizowanego *Ramalina terebrata* – 131.4 m<sup>2</sup>/g (Harańczyk, Pater, i in. 2012), zaś dla ziaren komosy ryżowej – 298 m<sup>2</sup>/g (Tolaba i in. 2004)

Odwrotności iloczynu parametrów  $c'$  i  $k$  uzyskane dla modelu GAB<sub>1</sub>, jakie zgodnie z formalizmem Denta można traktować jako ułamek niezajętych miejsc pierwotnie wiążących w wilgotności  $h = 1$ , dla wszystkich gatunków są mniejsze od 1%, co wskazywałoby na silną hydrofilowość powierzchni dostępnych dla wiązania wody z fazy gazowej.

Parametr  $w$  z modelu GDW jest bliski jedności dla pokryw *D. comatus*, co oznacza, że większość zaadsorbowanych molekuł wody staje się miejscem wiążącym dla kolejnych w stosunku 1:1. Wskazywałoby na proces sorpcji przewidziany przez model GAB<sub>1</sub>. W przypadku pozostałych dwóch gatunków, *L. glabrirostris* i *T. molitor*, współczynnik ten wynosi odpowiednio 0.24 i 0.18. Zgodnie z założeniem modelu oznacza to, że tylko taka część zaadsorbowanych cząsteczek wody może być wtórnym miejscem wiążącym, co może wynikać z ograniczeń geometrycznych na powierzchni pokryw, w szczególności z ich zwiększonej porowatości w porównaniu do pokryw *D. comatus*.

Ugrozov i wsp. (Ugrozov i in. 2008) przeprowadzili badania sorpcji wody na biomateriałach chitynowych, a mianowicie na dostępnej komercyjnie chitynie technicznej otrzymywanej ze stawonogów oraz na chitynie pochodzącej z ciała pszczoły. Pomimo tego, że przed pomiarami sorpcyjnymi wygrzewali materiał w 150°C przez 8 h (a względem tak uzyskanej suchej masy normowali wyniki), to wartości, jakie otrzymali były zbliżone do uzyskanych w trakcie niniejszych badań ( $k = 0.78$  i  $k = 0.83$ ,  $c' = 35$  i  $c' = 155$ ,  $m_0 = 0.058$  i  $m_0 = 0.051$  – po przeliczeniu na formalizm izotermy  $GAB_1$ ). Uzyskane w pracy Ugrozova dane zostały dobrze opisane modelem Denta (a przynajmniej w zakresie wilgotności względnych 0-0.9) i autorzy określają badany materiał jako hydrofilowy, podczas gdy w przypadku całych pokryw chrząszczy, część powierzchni jest silnie hydrofobowa ze względu na obecność wosków ochronnych (Lockey 1960; Sun i in. 2012).

Dokładna analiza szerokiej linii dla wszystkich trzech badanych gatunków wykazała, że poszerzenie gaussowskie dopasowanego dubletu Pake'a jest na tyle duże, że do opisu sygnału wystarczy sama funkcja Gaussa. Podobnie nieuzasadnione byłoby też użycie modelu Abragama, stosowanego często w opisie matrycy stałej plechy grzybów zlichenizowanych, w którym zakres pól lokalnych w ciele stałych różni się od przypadkowego (Harańczyk, Nowak, i in. 2012). Szerokość linii Gaussa praktycznie nie zależy od gatunku, temperatury czy poziomu uwodnienia i wynosi ok. 45 kHz. Oznacza to, że skład molekularny pokryw badanych gatunków nie zmienia się znacząco, pomimo tego, że reprezentują one różne grupy systematyczne (dwie różne rodziny i trzy rodzaje) chrząszczy.

Zależność hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego, wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, została opisana funkcją liniową, co wskazuje na to, że matryca stała nie zawiera substancji rozpuszczalnych we wodzie. Pokrywy są częściami ciała owada najbardziej eksponowanymi na środowisko i można przypuszczać, że brak takich substancji zwiększa odporność pokrywy na czynniki środowiskowe.

Eksperyment typu *IR* pozwolił wyznaczyć efektywne czasy relaksacji spinowo-sięciowej. Woda luźno związana do pokryw charakteryzuje się czasem  $T_1$  rzędu 0.01 s, czas dla wody ściśle związanej jest dłuższy, rzędu 0.1 s, i porównywalny z czasem relaksacji spinowo-sięciowej protonów matrycy stałej. Czas relaksacji podłużnej jest mało zależny od poziomu uwodnienia próbki – w badanym zakresie hydratacji  $T_1$  pozostaje stałe (dla pokryw *D. comatus*) bądź nieznacznie maleje (dla pokryw *L. glabrirostris* i *T. molitor*) z rosnącym poziomem uwodnienia. W przypadku innych układów biologicznych, np. tkanki mięśniowej (Belton & Packer 1974) czy uwodnionej celulozy (Sasaki i in. 1960), obserwowano efekt



odwrotny. Z eksperymentów selektywnego wzbudzenia wiadomo, że w układzie chitynowa pokrywa – woda hydratacyjna dochodzi do wymiany magnetyzacji (patrz rozdział 7.7.1), co skutkuje tym, że zmierzony, efektywny czas  $T_1$  jest wypadkową rzeczywistego czasu relaksacji ciała stałego (relaksacja wolniejsza) i wody (relaksacja szybsza). Efekt szybszej relaksacji wody w materiale o niższym poziomie hydratacji może wynikać więc z tego, że wymiana magnetyzacji, zgodnie ze wzorami (100) i (101), w większym stopniu wpływa na mierzony czas relaksacji frakcji cieczowej dla układów o niskim poziomie uwodnienia (Edzes & Samulski 1978).

Wartości energii aktywacji cząsteczek wody obliczone na podstawie kształtu temperaturowej zależności czasu relaksacji podłużnej dla pokryw gatunków *D. comatus*, *L. glabrirostris* ( $\Delta m/m_0 = 0.145$ ) i *T. molitor* zawierają się w zakresie wyznaczonym dla rotacji cząsteczki wody wokół wiązania wodorowego (Bruni i Leopolo 1992). Jedynie woda związana do pokryw *L. glabrirostris* o niskim poziomie uwodnienia wyróżnia się względnie niską energią aktywacji (~6 kJ/mol). Dla pokryw *T. molitor* o niskim poziomie uwodnienia udało się zaobserwować dwie linie cieczowe charakteryzujące się istotnie różnymi wartościami energii aktywacji (ok. 8 i 27 kJ/mol). Dla pokryw o dwukrotnie wyższym poziomie uwodnienia zarejestrowano jedynie jedną linię, której odpowiada energia aktywacji 27 kJ/mol. To sugeruje interpretację, że woda ściśle związana do powierzchni jest widoczna w eksperymencie *IR* jedynie dla niskich wartości  $\Delta m/m_0$ , wraz z rosnącą hydratacją materiału woda luźno związana zaczyna majoryzować sumaryczny sygnał cieczowy. Fakt, że frakcja związana do powierzchni matrycy stałej cechuje się niższą wartością energii aktywacji może wynikać z tego, że rozmiar klastra sieci wiązań wodorowych jest w jej przypadku mniejszy niż w przypadku wody swobodnej (luźno związanej). Taki efekt słabszego związania ściśle związanej wody z wodą luźno związaną (w porównaniu do wiązania wody ściśle związanej z powierzchnią) został zaobserwowany dla innych biomolekuł, przykładowo dla uwadnianego DNA (Tao 1993).

Dopasowanie pełnego modelu BPP pozwoliło na wyznaczenie średniej odległości między oddziałującymi ze sobą protonami zaadsorbowanej wody; dla pokryw gatunków *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor* otrzymano odpowiednio wartości 1.67, 1.66 i 1.86 oraz 1.74 Å. Wartości te są zbliżone do wartości wyznaczonych dla innych układów zawierających wodę, np. chlorku heksaakwastrontu (Hetmańczyk i in. 2014) czy kompleksów DNA-surfaktant (Kobierski 2013).

W ramach pracy zanalizowano czasy relaksacji poprzecznej  $T_2$  i  $T_2^*$  protonów zawartych w matrycy pokryw oraz protonach wody do nich zaadsorbowanych. Czasy relaksacji  $T_{2G}^*$  są zbliżone do wartości otrzymanych w pomiarach MRJ w domenie czasu dla pokryw

*L. glabrirostris* (Harańczyk, Florek, i in. 2012), jak również dla wielu układów biologicznych o niskiej hydratacji uzyskane z eksperymentów MRJ wykonywanych w domenie czasu (przykładowo kiełkujące nasiona we wstępnych fazach rozwoju (Harańczyk i in. 1996), czyste DNA (Harańczyk i in. 2010), plechy grzybów zlichenizowanych (Harańczyk i in. 2015; Harańczyk, Pater, i in. 2012; Harańczyk i in. 2008; Harańczyk i in. 1998)). Świadczy to o znacznym podobieństwie grup chemicznych występujących w układach biologicznych oraz o zbliżonych wartościach pól lokalnych w skali odległości badanej w eksperymentach MRJ. Istotna różnica między faktycznym czasem relaksacji poprzecznej (wyznaczonym za pomocą sekwencji CPMG) a czasem efektywnym (wyznaczonym z szerokości połówkowej linii) wynika z oddziaływania jąder wodoru z lokalnymi polami magnetycznymi wytworzonymi przez obecne w matrycy stałej paramagnetyki (Barnhart i Berk 1986). Horčičko i Voráčová wyznaczyli fotometrycznie zawartość metali w pokrywach szeregu fitofagicznych chrząszczy, w tym w pokrywach badanych w tej pracy gatunków *D. comatus* i *L. glabrirostris*; wśród wielu innych metali w pokrywach tych ryjkowców dominują sód (odpowiednio 350034 i 43344 mmol/g), potas (224 i 223 mmol/g), magnez (69 i 66 mmol/g) i mangan (0.63 i 1.78 mmol/g) (Horčičko & Voráčová 1999). Tak wysoka zawartość substancji paramagnetycznych tłumaczy poszerzenie linii (i zapewne skrócenie czasu relaksacji podłużnej). Dla pokryw *D. comatus* ( $\Delta m/m_0 = 0.077$ ) w temperaturze 300 K oszacowano niejednorodność pola  $\Delta B_0$  wywołaną obecnością tych pierwiastków na ok. 39 mT.

Czasy relaksacji poprzecznej wyznaczone w funkcji temperatury nie dają się opisać równaniem Arrheniusa, tzn. energie aktywacji wody luźno związanej wyznaczone z zależności  $T_2(1000/T)$  (patrz równanie (97)) zmieniają się. Efekt ten jest typowy dla przechłodzonych cieczy, choć nie wykazano jeszcze jednoznacznie, czym jest spowodowany. Energie aktywacji wody luźno związanej w temperaturze pokojowej wynoszą odpowiednio 5.9, 5.8 i 8 oraz 6 kJ/mol dla pokryw *L. glabrirostris*, *D. comatus* oraz *T. molitor* i są zbliżone do energii oddziaływania van der Waalsa w wodzie swobodnej równej 5.5 kJ/mol (Henry 2002).

Szybkości transferu magnetyzacji podłużnej między frakcją cieczową a stałą matrycą tkanki zwiększają się monotonicznie z malejącą temperaturą, co wskazuje na to, że transfer magnetyzacji nie ma charakteru wymiany chemicznej, ale czystej relaksacji krzyżowej (ang. *cross-relaxation*) (Tanner i in. 1991). Wymiana ta nie jest na tyle szybka, by móc ją całkowicie zaniedbać w analizie odrostu magnetyzacji - dla pokryw gatunku *D. comatus* ( $\Delta m/m_0 = 0.077$ ) w 295 K szybkości transferu wynoszą 70 i 316 s<sup>-1</sup> dla protonów ciała stałego i wody, podczas gdy szybkość relaksacji określona jako  $R_1 = 1/T_1$  wynosi odpowiednio 4.2 i 5.2 s<sup>-1</sup>.

Szybkość transferu magnetyzacji z ciała stałego do wody jest zbliżona do wartości wyznaczonej dla uwodnionej skrobi (w temperaturze pokojowej równej  $86 \text{ s}^{-1}$ ) (Witek i in. 2006).

Wartość  $p_2/p_1$ , czyli stosunek puli protonów cieczowych do puli protonów ciał stałowych biorących udział w wymianie magnetyzacji, jest mniejszy niż wynika to ze stosunku pól pod linią Lorentza i Gaussa  $A^L/A^S$ . Wynika to z silnej zależności szybkości relaksacji od odległości ( $R \sim r^{-6}$ ), co oznacza że wkład do relaksacji krzyżowej mogą wnieść tylko protony znajdujące się blisko siebie. Pola pod linią są zaś miarą ilości danej puli protonów w całej objętości próbki znajdującej się wewnątrz cewki nadawczo-odbiorczej.

Żaden ze zmierzonych parametrów (stosunek  $A^L/A^S$ , czasy relaksacji podłużnej czy poprzecznej) nie zmienia się skokowo w zbadanym zakresie temperatur, w szczególności nie zaobserwowano równowagowego zamarzania wody w temperaturze  $0^\circ\text{C}$ . Oznacza to, że w pokrywach chrząszczy nie zachodzi proces zamarzania wody z tworzeniem kryształów lodu. Wraz ze spadkiem temperatura woda zaadsorbowana do powierzchni matrycy stałej pokryw ulega stopniowemu unieruchomieniu, co manifestuje się wydłużeniem czasu  $T_1$  i skróceniem czasu  $T_2$ , ale nie występuje kooperatywne zamarzanie na mierzalną skalę. Pośrednim argumentem za zamarzaniem przechłodzonej wody w izolowanych kawernach pokrywy może być zarejestrowany stopniowy spadek sygnału cieczowego, wyrażonego w jednostkach (niezmiennego) sygnału od ciała stałego. Wydaje się więc, że pokrywa chrząszcza jest tkanką, w której udało się zaobserwować dwa typy procesu unieruchamiania molekuł wody związanej, podobnie jak w układach uwodnionych modelowych błon lipidowych (Bronshteyn i Steponkus 1993).

Na profilu dyspersji szybkości relaksacji podłużnej zaobserwowano tzw. maksima kwadrupolowe, będące efektem przyśpieszenia relaksacji dla częstości larmorowskich odpowiadających przejściom kwadrupolowym obecnych w układzie jąder o spinie  $>1/2$ . Położenie maksimów wskazuje na to, że w przypadku pokryw jądrem kwadrupolowym dającym taki efekt jest  $^{14}\text{N}$  (Winter i Kimmich 1985; Sunde i Halle 2010; Nolte i in. 2002). Sama chityna zawiera prawie 7% azotu (Carlström 1957), który jest ponadto obecny w białkach kutikulanych - stąd tak wyraźny efekt transferu energii.

Wyznaczone z położenia maksimów stała sprzężenia kwadrupolowego i parametr asymetrii wynoszą odpowiednio  $a_{qcc} = 3.305 \pm 0.004 \text{ MHz}$  i  $\eta = 0.445 \pm 0.003$ . Esrafilii i współautorzy wyliczyli na gruncie teorii DFT wartości  $a_{qcc}$  i  $\eta$  dla bezwodnego chitozanu, czyli podstawowej pochodnej chityny powstającej w wyniku jej alkalicznej deacetylacji. W zależności od bazy funkcyjnej wybranej do obliczeń otrzymali stałą sprzężenia

kwadrupolowego równą 5.71/5.57 MHz oraz parametr asymetrii wynoszący 0.30/0.39 (Esrafil i in. 2007). Różnica między wartościami wyznaczonymi wynika głównie z różnicy w strukturze badanych biopolimerów. Bezwodny chitozan tworzy, podobnie jak  $\alpha$ -chityna, układ rombowy (grupa przestrzenna P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>), ale ma mniej wydłużoną komórkę elementarną (patrz Tab. 8), co przekłada się na inny rozkład ładunku elektrycznego, a tym samym inne energie oddziaływań kwadrupolowych w układzie.

Tabela 8 Parametry krystalograficzne chityny i chitozanu (Se-Kwon 2010)

	a [°A]	b [°A]	c [°A]	Grupa przestrzenna
$\alpha$ -chityna	4.74	18.86	10.32	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
$\beta$ -chityna	4.85	9.26	10.38	P2 <sub>1</sub>
chitozan	8.95	16.97	10.34	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
bezwodny chitozan	8.26	8.50	10.43	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>

## 9 Wnioski

1. Zdjęcia wykonane techniką skaningowej mikroskopii elektronowej potwierdziły wysoką porowatość badanych układów. Pokrywy każdego gatunku łączą wielowarstwowa struktura określana mianem sklejki o skręconych warstwach. Zaobserwowano liczne wytwory i pory na powierzchniach brzusznych i grzbietowych pokryw, tzw. mikrowłoski, charakterystyczne dla każdego gatunku. Wśród nich zidentyfikowano mechanizm unieruchamiający złożone pokrywy na tułowiu *T. molitor*.
2. Analiza różnych modeli izotermy sorpcyjnej nie przyniosła rozstrzygnięcia, jaki jest mechanizm sorpcji wielowarstwowej na pokrywach chrząszczy. Parametry dopasowania sugerują jednak, że układem o największej hydrofobowości są pokrywy *T. molitor*, a najmniejszej zaś pokrywy *L. glabrirostris*. Dopasowanie modelu GDW sugeruje, że pokrywy *T. molitor* charakteryzują się największą porowatością, pokrywy *D. comatus* - najmniejszą.
3. Widma  $^1\text{H-NMR}$  są sumą sygnału od matrycy stałej tkanki oraz sygnałów od wody różniącej się mobilnością: od wody ściśle oraz od wody luźno związanej na powierzchniach. Linia pochodząca od protonów matrycy stałej jest dobrze opisywana funkcją Gaussa. Jej szerokość dla wszystkich gatunków, temperatur i poziomu uwodnienia pozostaje na tym samym poziomie i wynosi ok. 45 kHz. Linie cieczowe dały się dobrze odtworzyć przez funkcje Lorentza o szerokości 0.7-3 kHz. Zależność hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego  $A^L/A^S$  jest dobrze opisywana funkcją liniową, co sugeruje brak frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie. Dla niskich poziomów uwodnienia układu można zaobserwować wodę ściśle związaną do powierzchni matrycy stałej pokryw; dla wyższych hydratacji sygnał  $^1\text{H-NMR}$  jest zdominowany przez wodę luźno związaną.
4. Czasy relaksacji podłużnej składowych cieczowych nieznacznie zmniejszają się wraz z rosnącym poziomem uwodnienia, co może oznaczać, że są wartościami uśrednionymi dla podukładów będących w reżimie szybkiej wymiany spinowej. Dla frakcji wody ściśle związanej przyjmują wartości rzędu 0.1 s, dla frakcji wody luźno związanej – rzędu 0.01 s. Czas relaksacji  $T_1$  protonów matrycy stałej zmieniają się w zakresie 0.2-0.4, 0.3-0.55, 0.6-0.9 s odpowiednio dla pokryw *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor*. Wartości energii aktywacji cząsteczek wody dla pokryw *D. comatus*,

*L. glabrirostris* i *T. molitor* zawierają się w zakresie wyznaczonym dla rotacji cząsteczki wody wokół pojedynczego wiązania wodorowego.

5. Średnia odległość między wodorami zaadsorbowanej wody wynosi 1.73 Å. Największe odchylenie od wartości średniej wykazują odległości dla dwóch składowych cieczowych wyznaczone dla pokryw *T. molitor* (1.86 oraz 1.74 Å). Wyznaczone wartości są średnią zmierzoną po całej próbce, dla porównania odległości między wodorami w obecnych w układach biologicznych grupach H-C-H oraz H-O-H wynoszą odpowiednio 1.86 Å oraz 1.5 Å.
6. Czasy relaksacji poprzecznej  $T_2$  wody luźno związanej w sposób istotny różnią się od czasów odpowiadających im czasów  $T_2^*$ , co wskazuje na obecność substancji paramagnetycznych, jakie zmieniają pola lokalne i przyspieszają efektywną relaksację. Dla pokryw *D. comatus* oszacowano wartość niejednorodności pola na 39 mT.
7. W pokrywach chrząszczy nie zaobserwowano procesu kooperatywnego zamarzania wody. Wraz ze spadkiem temperatury linia pochodząca od wody monotonicznie poszerza się (co wskazuje na stopniową immobilizację molekuł wody), a pole pod nią zmniejsza się. Sygnał cieczowy nie zanikł w 273 K, lecz był możliwy do zaobserwowania nawet w temperaturach ok. 240 K.
8. Woda luźno związana w pokrywach cechuje się niearheniusowską zależnością od temperatury – jej energia aktywacji rośnie wraz ze spadkiem temperatury.
9. Zaobserwowano zjawisko transferu magnetyzacji między pulami protonów: cieczową i ciałostalową, mające charakter czystej relaksacji krzyżowej. Szybkość wymiany stanowi do kilku procent szybkości relaksacji podłużnej, więc efekt ten powinien być uwzględniany w analizie zmiany magnetyzacji podłużnej w czasie.
10. Proces transferu magnetyzacji między jądrami wodoru a jądrami azotu zmanifestował się jako przyspieszenie relaksacji podłużnej dla określonych częstości larmorowskich protonów (wystąpiły tzw. maksima kwadropolowe na wykresie  $1/T_1(B)$ ). Wyznaczono współczynnik sprzężenia kwadropolowego:  $a_{qc} = 3.305$  MHz oraz parametr asymetrii:  $\eta = 0.445$ .

# 10 Literatura

- [1] Abragam, A., 1961. *The principles of nuclear magnetism*, Oxford: Oxford University Press.
- [2] Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J., 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics International*, 11, ss.36–41.
- [3] Agudelo-Laverde, L.M., Schebor, C. & Buera, M.D.P., 2014. Proton mobility for the description of dynamic aspects of freeze-dried fruits. *Journal of Food Engineering*, 125, ss.44–50.
- [4] Aguerre, R.J., Suarez, C. & Viollaz, P.E., 1989. New BET Type Multilayer Sorption Isotherms. 1. Theoretical Derivation of the Model. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 22(4), ss.188–191.
- [5] Ahearn, G.A., 1970. The control of water loss in desert tenebrionid beetles. *The Journal of experimental biology*, 53(3), ss.573–95.
- [6] Akaike, H., 1992. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *Breakthroughs in statistics*, ss.610–624.
- [7] Andersen, S.O., Hojrup, P. & Roepstorff, P., 1995. Mini-Review Insect Cuticular Proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25(2), ss.153–176.
- [8] Ariahu, C.C., Kaze, S.A. & Achem, C.D., 2006. Moisture sorption characteristics of tropical fresh water crayfish (*Procambarus clarkii*). *Journal of Food Engineering*, 75(3), ss.355–363.
- [9] Aroulmoji, V. i in., 2012. Hydration properties and proton exchange in aqueous sugar solutions studied by time domain nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 132(4), ss.1644–1650.
- [10] Atkins, E., 1985. Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. *Journal of Biosciences*, 8(1-2), ss.375–387.
- [11] Barbosa-Cánovas, G. V i in., 2008. *Water activity in foods: fundamentals and applications*, Blackwell Publishing.
- [12] Barnhart, J. & Berk, R., 1986. Influence of paramagnetic ions and pH on proton NMR relaxation of biologic fluids. *Investigative Radiology*, 21(2), ss.132–136.
- [13] Basu, S., Shivhare, U.S. & Mujumdar, A.S., 2006. Models for Sorption Isotherms for Foods: A Review. *Drying Technology*, 24(8), ss.917–930.
- [14] Batista, E.R., Xantheas, S.S. & Jónsson, H., 1998. Molecular multipole moments of water molecules in ice Ih. *The Journal of Chemical Physics*, 109(11), ss.4546–4551.

- [15] Belton, P.S. & Packer, K.J., 1974. Pulsed NMR studies of water in striated muscle. 3. The effects of water content. *Biochimica et biophysica acta*, 354(2), ss.305–314.
- [16] Black, M. & Pritchard, H.W., 2002. *Desiccation and Plant Survival*, Wallingford: CABI Publishing.
- [17] Bloembergen, N., Purcell, E.M. & Pound, R.V., 1948. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review*, 73(7), ss.679–712.
- [18] Bouchard, P. i in., 2011. Family-group names in Coleoptera (Insecta). *ZooKeys*, (88), ss.1–972.
- [19] Bronshteyn, V.L. & Steponkus, P.L., 1993. Calorimetric studies of freeze-induced dehydration of phospholipids. *Biophysical journal*, 65(5), ss.1853–1865.
- [20] Brunauer, S., Emmett, P.H. & Teller, E., 1938. Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 407(1), ss.309–319.
- [21] Bruni, F. & Leopolo, A.C., 1992. Pools of water in anhydrobiotic organisms: A thermally stimulated depolarization current study. *Biophysical journal*, 63(3), ss.663–672.
- [22] Burakowski, B., Mroczkowski, M. & Stefańska, J., 2000. *Katalog Fauny Polski, część XXIII, Tom 22. Chrząszcze Coleoptera*, Warszawa: MiIZ PAN.
- [23] Carlström, D., 1957. The crystal structure of  $\alpha$ -chitin. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 3(5), ss.669–683.
- [24] Chapman, R.F., 1998. *The insects: structure and function*, Cambridge: Cambridge University Press.
- [25] Coleoptera Poloniae, <http://coleoptera.ksib.pl> [Udostępniono maj 27, 2016].
- [26] Cowan, B., 2005. *Nuclear magnetic resonance and relaxation*, Cambridge: Cambridge University Press.
- [27] Crowson, R.A., 1981. *The biology of the Coleoptera.*, London: Academic Press.
- [28] D'Arcy, R.L. & Watt, I.C., 1970. Analysis of sorption isotherms of non-homogeneous sorbents. *Transactions of the Faraday Society*, 66, s.1236.
- [29] Dent, R., 1977. A Multilayer Theory for Gas Sorption Part I: Sorption of a Single Gas. *Textile Research Journal*, 47, ss.145–152.
- [30] Derbyshire, W. i in., 2004. Fitting of the beat pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solutions. *Journal of magnetic resonance*, 168(2), ss.278–283.
- [31] Dirks, J.-H. & Taylor, D., 2012. Fracture toughness of locust cuticle. *The Journal of experimental biology*, 215(9), ss.1502–8.



- [32] Edzes, H.T. & Samulski, E.T., 1978. The measurement of cross-relaxation effects in the proton NMR spin-lattice relaxation of water in biological systems: Hydrated collagen and muscle. *Journal of Magnetic Resonance*, 229(2), ss.207–229.
- [33] Eisenberg, D.S. & Kauzmann, W., 1969. *The structure and properties of water*, New York: Oxford University Press.
- [34] Esrafil, M.D., Elmi, F. & Hadipour, N.L., 2007. Density functional theory investigation of hydrogen bonding effects on the oxygen, nitrogen and hydrogen electric field gradient and chemical shielding tensors of anhydrous chitosan crystalline structure. *The journal of physical chemistry. A*, 111(5), ss.963–970.
- [35] Falińska, K., 2008. *Dynamika kationu guanidynowego w wybranych kryształach molekularno-jonowych badana metodą NMR*. Praca doktorska. Poznań: Instytut Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk.
- [36] Fedorenko, D.N., 2009. *Evolution of the beetle hind wing, with special reference to folding (Insecta, Coleoptera)*, Sofia-Moscow: PENSOFT Publishers.
- [37] Florek, M., 2010. *Wstępne fazy uwadniania kutikuli stawonogów badane metodą NMR oraz izotermi sorpcyjnej*. Praca magisterska. Kraków: Uniwersytet Jagielloński.
- [38] Fujara, F. i in., 1980. Cross-relaxation processes of polarized b-active nuclei in various crystalline solids. *Zeitschrift für Physik B*, 37, ss.151–161.
- [39] Furmaniak, S., Terzyk, A.P., Gauden, P.A., i in., 2007. Applicability of the generalised D'Arcy and Watt model to description of water sorption on pineapple and other foodstuffs. *Journal of Food Engineering*, 79(2), ss.718–723.
- [40] Furmaniak, S. i in., 2009. Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity. *Food Research International*, 42(8), ss.1203–1214.
- [41] Furmaniak, S., Terzyk, A.P., Czepirski, L., i in., 2007. Water Sorption on Foodstuffs - Alternative Models. W V. N. Pletney, red. *Focus on Food Engineering Research and Developments*. Nova Science Publishers, Inc.
- [42] Furmaniak, S., Terzyk, A. & Gauden, P., 2007. The general mechanism of water sorption on foodstuffs – Importance of multitemperature fitting of data and the hierarchy of models. *Journal of Food Engineering*, 82(4), ss.528–535.
- [43] Gillen, K.T., Douglass, D.C. & Hoch, M.J.R., 1972. Self-Diffusion in Liquid Water to  $-31^{\circ}\text{C}$ . *The Journal of Chemical Physics*, 57(12), s.5117.
- [44] Gorb, S.N., 1998. Frictional surfaces of the elytra-to-body arresting mechanism in tenebrionid beetles (Coleoptera: Tenebrionidae): design of co-opted fields of

microtrichia and cuticle ultrastructure. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 27(3), ss.205–225.

- [45] Gorb, S.N., 1997. Ultrastructural architecture of the microtrichia of the insect cuticle. *Journal of Morphology*, 234(1), ss.1–10.
- [46] Grabda, E. red., 1985. *Zoologia: bezkręgowce. Praca zbiorowa. T. 2, cz. 2*, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- [47] Guo, C., Song, W. & Dai, Z., 2012. Structural design inspired by beetle elytra and its mechanical properties. *Chinese Science Bulletin*, 57(8), ss.941–947.
- [48] Gupta, N.S., 2011. *Chitin. Formation and Diagenesis*, Springer.
- [49] Harańczyk, H. i in., 2015. A method of water-soluble solid fraction saturation concentration evaluation in dry thalli of Antarctic lichenized fungi, in vivo. *Biochimica et biophysica acta. General Subjects*, 6, ss.226–235.
- [50] Harańczyk, H., Nowak, P., i in., 2012. Bound water freezing in Antarctic *Umbilicaria aprina* from Schirmacher Oasis. *Antarctic Science*, 24(04), ss.342–352.
- [51] Harańczyk, H., Pater, Ł., i in., 2012. Initial Phases of Antarctic *Ramalina terebrata* Hook f. & Taylor Thalli Rehydration Observed by Proton Relaxometry. *Acta Physica Polonica A*, 121(2), ss.480–484.
- [52] Harańczyk, H. i in., 2010. Initial phases of DNA rehydration by NMR and sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A*, 117(2), ss.397–402.
- [53] Harańczyk, H., 2003. *On water in extremely dry biological systems*, Kraków: WUJ.
- [54] Harańczyk, H. i in., 1996. The initial stages of wheat (*Triticum aestivum*, L.) seed imbibition as observed by proton nuclear magnetic relaxation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 115, ss.47–54.
- [55] Harańczyk, H., Florek, M., i in., 2012. Water Bound in Elytra of the Weevil *Liparus glabrirostris* (Küster, 1849) by NMR and Sorption Isotherm (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Physica Polonica A*, 121(2), ss.491–496.
- [56] Harańczyk, H., Bacior, M. & Olech, M.A., 2008. Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm. *Antarctic Science*, 20(6), s.527.
- [57] Harańczyk, H., Gałdziński, S. & Olech, M., 1998. Initial stages of lichen hydration observed by proton magnetic relaxation. *New Phytologist*, 138(2), ss.191–202.
- [58] Harańczyk, H. & Kobierski, J., 2012. Rehydration of CTMA Modified DNA Powders Observed by NMR. *Acta Physica Polonica A*, 121(2), ss.485 – 490.
- [59] Hennel, J.W. & Klinowski, J., 2000. *Podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego*,

Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM.

- [60] Henry, M., 2002. Nonempirical quantification of molecular interactions in supramolecular assemblies. *ChemPhysChem*, 3(7), ss.561–569.
- [61] Hetmańczyk, J. i in., 2014. Vibrations and reorientations of H<sub>2</sub>O molecules in [Sr(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]Cl<sub>2</sub> studied by Raman light scattering, incoherent inelastic neutron scattering and proton magnetic resonance. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 124, ss.429–40.
- [62] Holloway, B.A., 1997. Elytral surface structures as indicators of relationships in stag beetles, with special reference to the New Zealand species (Coleoptera: Lucanidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 24(1), ss.47–64.
- [63] Horčíčko, I. & Voráčová, Š., 1999. Contents of Metals and Phosphorus in Dehydrated Biomass of Phytophagous and Zoophagous Insects. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium Biologica*, 37.
- [64] Johansson, L.C. i in., 2012. Elytra boost lift, but reduce aerodynamic efficiency in flying beetles. *Journal of the Royal Society, Interface*, 9(75), ss.2745–8.
- [65] Jollès, P. & Muzzarelli, R.A.A., 1999. *Chitin and chitinases*, Springer.
- [66] Kamp, T. van de & Greven, H., 2010. On the architecture of beetle elytra. *Entomologie heute*, 22, ss.191–204.
- [67] Klocke, D. & Schmitz, H., 2011. Water as a major modulator of the mechanical properties of insect cuticle. *Acta biomaterialia*, 7(7), ss.2935–2942.
- [68] Klowden, M.J., 2013. *Physiological systems in insects*, Moscow: Academic Press.
- [69] Knutelski, S., 2005. *Różnorodność, ekologia i chorologia ryjkowców rezerwatu biosfery „Tatry” (Coleoptera: Curculionoidea)*, Kraków: Wydawnictwa ISEZ PAN.
- [70] Kobierski, J., 2013. *Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant*. Praca doktorska. Kraków: Uniwersytet Jagielloński.
- [71] Krzelj, S., 1969. Structure anatomique comparée des élytres de Coléoptères. *Soc Roy Zool Belg Ann*.
- [72] Le Lagadec, M.D., Chown, S.L. & Scholtz, C.H., 1998. Desiccation resistance and water balance in southern African keratin beetles (Coleoptera, Trogidae): the influence of body size and habitat. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 168(2), ss.112–122.
- [73] Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical society*, 345(1914), ss.1361–1403.
- [74] Lapointe, S.L., Hunter, W.B. & Alessandro, R.T., 2004. Cuticular hydrocarbons on

- elytra of the Diaprepes root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 6(4), ss.251–257.
- [75] Lewicki, P., 1998. A three parameter equation for food moisture sorption isotherms. *Journal of food process engineering*, 21(2), ss.127–144.
- [76] Lockey, K.H., 1960. The thickness of some insect epicuticular wax layers. *Journal of Experimental Biology*, 37(September), ss.316–329.
- [77] Machin, J., Smith, J. & Lampert, G., 1994. Evidence for Hydration-Dependent Closing of Pore Structures in the Cuticle of *Periplaneta Americana*. *The Journal of experimental biology*, 192(1), ss.83–94.
- [78] Melian-Flamand, C., 2009. *Advanced NMR analysis of polymers and biomolecules*. RWTH Aachen University.
- [79] Merzendorfer, H. & Zimoch, L., 2003. Review Chitin metabolism in insects : structure , function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), ss.4393–4412.
- [80] Mun, S. i in., 2015. Cuticular protein with a low complexity sequence becomes cross-linked during insect cuticle sclerotization and is required for the adult molt. *Scientific Reports*, 5, s.10484.
- [81] Nolte, M. i in., 2002.  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  cross-relaxation in trinitrotoluene - a step toward improved landmine detection. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35(9), ss.939–942.
- [82] Olek, W., Majka, J. & Czajkowski, Ł., 2013. Sorption isotherms of thermally modified wood. *Holzforschung*, 67(2), ss.1–9.
- [83] Ościk, J., 1979. *Adsorpcja*, Warszawa: PWN.
- [84] Pake, G.E., 1948. Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line. *The Journal of Chemical Physics*, 16(4), ss.327–336.
- [85] Patel, S., Nelson, D.R. & Gibbs, a G., 2001. Chemical and physical analyses of wax ester properties. *Journal of insect science (Online)*, 1, ss.1–4.
- [86] Petrov, M. i in., 2013. Ab Initio Based conformational study of the crystalline  $\alpha$ -chitin. *Biopolymers*, 99(1), ss.22–34.
- [87] Prantner, A.M. i in., 2008. Magnetization transfer induced biexponential longitudinal relaxation. *Magnetic resonance in medicine*, 60(3), ss.555–63.
- [88] Price, W.S., Ide, H. & Arata, Y., 1999. Self-Diffusion of Supercooled Water to 238 K Using PGSE NMR Diffusion Measurements. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(4), ss.448–450.

- [89] Razowski, J., 1987. *Słownik entomologiczny*, Warszawa: PWN.
- [90] Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), ss.603–632.
- [91] Sasaki, M. i in., 1960. A Study of Sorbed Water on Cellulose by Pulsed NMR Technique. *Journal of the Physical Society of Japan*, 15(9), ss.1652–1657.
- [92] Se-Kwon, K., 2010. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications.*, CRC Press.
- [93] Sikora, A., Zieliński, S. & Giłka, W., 2015. Rozpucz lepiężnikowiec *Liparus glabrirostris* (Coleoptera: Curculionidae) na północy Polski - występowanie i propozycje ochrony. *Chrońmy Przyr. Ojcz.*, 71(5), ss.388–395.
- [94] Sing, K.S.W., 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and Applied Chemistry*, 57(4), ss.603–619.
- [95] Sitorus, P.E. i in., 2010. The Role of Elytra in Beetle Flight: I. Generation of Quasi-Static Aerodynamic Forces. *Journal of Bionic Engineering*, 7(4), ss.354–363.
- [96] Smreczyński, S., 1968. *Ryjkowce - Curculionidae: podrodziny Tanymecinae, Cleoninae, Tanyrhynchinae, Hylobiinae*, Warszawa: PWN.
- [97] Stebnicka, Z., 1991. *Czarnuchowate - Tenebrionidae, Boridae*, Warszawa, Wrocław: PWN.
- [98] Steele, W., Zgrablich, G. & Rudzinski, W., 1996. *Equilibria and dynamics of gas adsorption on heterogeneous solid surfaces*,
- [99] Suits, B.H., 2006. Nuclear quadrupole resonance spectroscopy. W D. Vij, red. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*. Springer US, ss. 65–96.
- [100] Sun, M. i in., 2012. Compound microstructures and wax layer of beetle elytral surfaces and their influence on wetting properties. *PloS one*, 7(10), ss.1–14.
- [101] Sunde, E.P. & Halle, B., 2010. Mechanism of  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  cross-relaxation in immobilized proteins. *Journal of magnetic resonance*, 203(2), ss.257–73.
- [102] Suresh, S.J. & Naik, V.M., 2000. Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data. *Journal of Chemical Physics*, 113(21), ss.9727–9732.
- [103] Tanner, S.F., Hills, B.P. & Parker, R., 1991. Interactions of sorbed water with starch studied using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 87(16), s.2613.
- [104] Tao, N.J., 1993. Light Scattering Spectroscopy Studies of the Water Molecules in DNA. W E. Westhof, red. *Water and Biological Macromolecules*. London: Macmillan

Education UK, ss. 266–292.

- [105] Tharanathan, R.N. & Kittur, F.S., 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(1), ss.61–87.
- [106] Thommes, M., 2010. Physical Adsorption Characterization of Nanoporous Materials. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(7), ss.1059–1073.
- [107] Tolaba, M.P. i in., 2004. Grain sorption equilibria of quinoa grains. *Journal of Food Engineering*, 61(3), ss.365–371.
- [108] Tower, W., 1906. Observations on the Changes in the Hypodermis and Cuticula of Coleoptera during Ecdysis. *Biological Bulletin*, 10(4), ss.176–192.
- [109] Tu, Y. & Laaksonen, A., 2000. The electronic properties of water molecules in water clusters and liquid water. *Chemical Physics Letters*, 329(October), ss.283–288.
- [110] Ugrozov, V. V. i in., 2008. Water vapor sorption by chitin-containing materials. *Colloid Journal*, 70(6), ss.780–783.
- [111] Villa, M. i in., 1983. NMR of water in biological systems. *Il Nuovo Cimento D*, 2(4), ss.1019–1032.
- [112] Vincent, J.F.V. & Wegst, U.G.K., 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod structure & development*, 33(3), ss.187–99.
- [113] Wigglesworth, V.B., 1945. Transpiration through the cuticle of insects. *Journal of Experimental Biology*, (November).
- [114] Winter, F. & Kimmich, R., 1985.  $^{14}\text{N}^1\text{H}$  and  $^2\text{H}^1\text{H}$  cross-relaxation in hydrated proteins. *Biophysical journal*, 48(2), ss.331–5.
- [115] Witas, T., 1995. *Aktywność chityny barierą w eksploatacji skorupiaków krylowych*, Szczecin: Wyższa Szkoła Morska w Szczecinie.
- [116] Witek, M. i in., 2006. Investigation of starch hydration by 2D time domain NMR. *Acta Physica Polonica A*, 109(3), ss.359–364.
- [117] Yu, M. i in., 2013. Mechanical and Frictional Properties of the Elytra of Five Species of Beetles. *Journal of Bionic Engineering*, 10(1), ss.77–83.
- [118] Zhixian, Y., Zhendong, D.A.I. & Ce, G.U.O., 2010. Morphology and mechanical properties of Cybister elytra. *Chinese Science Bulletin*, 55(8), ss.771–776.

# 11 Spis użytych skrótów

<b>AIC</b>	kryterium informacyjne Akaikego ( <i>Akaike Information Criterion</i> )
<b>BET</b>	(izoterma) izoterma Brunauer-Emmet-Taller
<b>BPP</b>	(model) model Bloembergen-Purcell-Pound
<b>CPMG</b>	(sekwencja) sekwencja Carra-Purcella-Meibooma-Gilla
<b>DFT</b>	teoria funkcjonałów gęstości ( <i>Density Functional Theory</i> )
<b>EFG</b>	gradient pola elektrycznego ( <i>Electric Field Gradient</i> )
<b>FC-NMR</b>	magnetyczny rezonans jądrowy zmiennego pola ( <i>Field-Cycling NMR</i> )
<b>FID</b>	sygnał zaniku swobodnej precesji ( <i>Free Induction Decay</i> )
<b>GAB</b>	(izoterma) izoterma Guggenheim-Anderson-de Boer
<b>GDW</b>	(izoterma) uogólniona izoterma Darcy'ego-Watta ( <i>Generalized Darcy-Watt</i> )
<b>IR</b>	(sekwencja) sekwencja zaniku inwersji ( <i>Inversion Recovery</i> )
<b>MRJ</b>	magnetyczny rezonans jądrowy
<b>NMR</b>	magnetyczny rezonans jądrowy ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>RF</b>	(impuls) impuls o częstotliwości radiowej ( <i>Radio Frequency</i> )
<b>RT</b>	czas repetycji ( <i>Repetition Time</i> )
<b>SEM</b>	skaningowy mikroskop elektronowy ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )





## 12 Spis symboli

$a_{qcc}$	stała sprzężenia kwadrupolowego
$\Delta m/m_0$	przyrost masy wyrażony w jednostkach suchej masy
$D$	stała sprzężenia dipolowego
$\eta$	parametr asymetrii oddziaływania kwadrupolowego
$E_{DD}$	energia oddziaływania dipolowego
$f_0$	położenie centrum linii rezonansowej
$f_{1/2}$	szerokość połówkowa linii
FT	transformata Fouriera
$\gamma$	czynnik żyromagnetyczny jądra
$g_n$	czynnik Landego
$h(=p/p_0)$	wilgotność względna (stosunek ciśnienia paru wodnej w powietrzu i ciśnienia pary nasyconej)
$\hbar$	zredukowana stała Plancka
$J_D$	rozszerzenie dipolowe
$k_B$	stała Boltzmanna
$L$	ciepło kondensacji
$\mu_0$	przenikalność magnetyczna próżni
$\mu_n$	magneton jądrowy
$m_p$	masa protonu
$M_{xy}$	składowa poprzeczna magnetyzacji
$M_z$	składowa podłużna magnetyzacji
$M_\infty$	wartość równowagowa wektora magnetyzacji
$p$	ciśnienie pary wodnej zawartej w powietrzu
$p_0$	ciśnienie pary nasyconej
$R$	stała gazowa
$R_1$	szybkość relaksacji podłużnej (spinowo-sieciowej)
S/N	stosunek sygnału do szumu
$\tau_c$	czas korelacji
$T_1$	czas relaksacji podłużnej (spinowo-sieciowej)
$T_2$	czas relaksacji poprzecznej (spinowo-spinowej)
$T_2^*$	efektywny czas relaksacji poprzecznej

$Q$	moment kwadrupolowy
$\chi$	podatność magnetyczna
$\omega_0$	częstość Larmore'a
$V_0$	objętość właściwa na jednostkę powierzchni
$V_{mono}$	objętość zaadsorbowanej monowarstwy
$V_{total}$	sumaryczna objętość adsorbatu

# 13 Spis rysunków

Rysunek 1 Wzór strukturalny chityny .....	4
Rysunek 2 Porównanie struktury $\alpha$ -chityny (po lewej) i $\beta$ -chityny (po prawej): (a) projekcja ac; (b) projekcja bc; (c) projekcja ab. Struktura zawiera dwie konformacje grup $-\text{CH}_2\text{OH}$ (89).....	5
Rysunek 3 Schematyczna budowa prokutikuli A. Antyrównoległe ułożone łańcuchy chitynowe. B. Nanowłókna utworzone z pęczków 18–25 łańcuchów ustabilizowanych białkami. C. Zgrupowane nanowłókna tworzące chitynowo-białkowe włókna o długości 50–300 nm. D. Chitynowo-białkowe sieci włókien. E. Struktura „skręconej sklejki” utworzona przez helikalnie ułożone warstwy chitynowo-białkowe. F. Przekrój przez kutikulę (67).....	8
Rysunek 4 Procesy sorpcji i desorpcji dla pierwszych dwóch warstw adsorbentu opisane przez model BET .....	18
Rysunek 5 Ciepło adsorpcji wody w funkcji numeru warstwy dla analizowanych modeli GAB (na podstawie (4)) .....	24
Rysunek 6 Schematyczne porównanie mechanizmów sorpcji z modeli GAB i GDW (na podstawie (40)) .....	26
Rysunek 7 Energia oddziaływania dipoli magnetycznych oddalonych o odległość $r$ dla wybranych orientacji względnych .....	33
Rysunek 8 Energia oddziaływania dipoli magnetycznych $\mu_1$ i $\mu_2$ odpowiadających jądrom o spinie $1/2$ .....	34
Rysunek 9 Zmiana poszczególnych składowych magnetyzacji w czasie oraz wykres $M_y(M_x)$ dla $T_1 = 600$ ms, $T_2 = 100$ ms.....	38
Rysunek 10 Schematycznie przedstawiona zależność czasów $T_1$ i $T_2$ od odwrotności temperatury .....	40
Rysunek 11 a) Model transferu magnetyzacji między dwoma rezerwuarami protonów: ciała stałego i wody, b) Zmiana zredukowanej magnetyzacji w czasie w zależności od szybkości transferu magnetyzacji (wyrażonej względem szybkości relaksacji podłużnej $R_{1i}=1/T_{1i}$ ). Linie ciągłe – składowa 1, linie przerywane – składowa 2 .....	41
Rysunek 12 Schematycznie przedstawiony warunek na zajście transferu polaryzacji między jądrami $^1\text{H}$ i $^{14}\text{N}$ przy $\eta = 0$ (na podstawie (39)).....	42
Rysunek 13 Zależność kształtu profilu wzbudzenia od długości impulsu $rf$ .....	44
Rysunek 14 Kształty linii opisujące sygnał od protonów ciała stałego: dublet Pake'a (a) oraz funkcja Abragama (b) .....	47
Rysunek 15 Skrócone drzewo filogenetyczne badanych gatunków chrząszczy .....	49

Rysunek 16 Sekwencje pomiarowe użyte w spektroskopii $^1\text{H-NMR}$ : impuls $\pi/2$ , sekwencja zaniku inwersji oraz sekwencja CPMG. Na niebiesko zaznaczono parametr zmieniany w czasie pomiaru .....	54
Rysunek 17 Pola używane podczas pomiaru metodą FC-NMR .....	55
Rysunek 18 Przekroje poprzeczne przez pokrywę <i>D. comatus</i> .....	56
Rysunek 19 Strona grzbietowa pokryw <i>D. comatus</i> .....	57
Rysunek 20 Strona brzuszna pokryw <i>D. comatus</i> .....	57
Rysunek 21 Przekroje poprzeczne przez pokrywę <i>L. glabrirostris</i> .....	58
Rysunek 22 Strona grzbietowa (z lewej) i brzuszna (z prawej) pokryw <i>L. glabrirostris</i> .....	59
Rysunek 23 Strona grzbietowa pokryw <i>T. molitor</i> .....	60
Rysunek 24 Przekroje poprzeczne przez pokrywę <i>T. molitor</i> .....	60
Rysunek 25 Strona brzuszna pokryw <i>T. molitor</i> .....	61
Rysunek 26 Mikrotrychia umiejscowione w centralnej części brzusznej strony pokryw <i>T. molitor</i> .....	61
Rysunek 27 Kinytyki hydratacji pokryw badanych chrząszczy. Linie ciągłe – dopasowanie funkcji (115). Szczegółowa analiza kinytyki hydratacji pokryw <i>L. glabrirostris</i> i <i>D. comatus</i> została przedstawiona w pracy (37) .....	62
Rysunek 28 Izotermy sorpcyjne (118)-(121) oraz ich postaci wielomianowe dla <i>D. comatus</i> (linia dla modelu $\text{GAB}_1$ pokrywa się z linią dla modelu GDW).....	65
Rysunek 29 Izotermy sorpcyjne (118)-(121) oraz ich postaci wielomianowe dla <i>L. glabrirostris</i> .....	65
Rysunek 30 Izotermy sorpcyjne (118)-(121) i ich postaci wielomianowe dla <i>T. molitor</i> .....	65
Rysunek 31 Schematyczne przedstawienie wag Akaikiego dla analizowanych modeli sorpcji wielowarstwowej w pokrywach a) <i>T. molitor</i> , b) <i>D. comatus</i> , i c) <i>L. glabrirostris</i> . Strzałki wskazują lepszy z porównywanych parami modeli, wartości liczbowe oznaczają stosunek wag Akaikiego danych modeli.....	67
Rysunek 32 a) Przykładowe widma $^1\text{H-NMR}$ zmierzone dla pokryw <i>D. comatus</i> w funkcji poziomu uwodnienia, b) Przykład dekompozycji widma na składowe: funkcja Gaussa (linia różowa), funkcje Lorentza (linia zielona oraz niebieska) .....	69
Rysunek 33 a) Przykładowe widma $^1\text{H-NMR}$ zmierzone dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> w funkcji poziomu uwodnienia, b) Przykład dekompozycji widma na składowe: funkcja Gaussa (linia różowa), funkcje Lorentza (linia zielona oraz niebieska) .....	69
Rysunek 34 a) Przykładowe widma $^1\text{H-NMR}$ zmierzone dla pokryw <i>T. molitor</i> w funkcji poziomu uwodnienia, b) Przykład dekompozycji widma na składowe: funkcja Gaussa (linia różowa), funkcje Lorentza (linie zielona oraz niebieska) .....	70
Rysunek 35 Porównanie modeli opisujących sygnał $^1\text{H-NMR}$ pochodzący od fazy stałej pokryw <i>D. comatus</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.077$ : a) model dopasowany do zmierzonego	

widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania .....	71
Rysunek 36 Porównanie modeli opisujących sygnał $^1\text{H-NMR}$ pochodzący od fazy stałej pokryw <i>D. comatus</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.145$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania .....	71
Rysunek 37 Porównanie modeli opisujących sygnał $^1\text{H-NMR}$ pochodzący od fazy stałej pokryw <i>L. glabrirostris</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.087$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania.....	72
Rysunek 38 Porównanie modeli opisujących sygnał $^1\text{H-NMR}$ pochodzący od fazy stałej pokryw <i>L. glabrirostris</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.138$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania.....	72
Rysunek 39 Porównanie modeli opisujących sygnał $^1\text{H-NMR}$ pochodzący od fazy stałej pokryw <i>T. molitor</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.106$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych; dopasowanie funkcją Gaussa praktycznie pokrywa się z dopasowaniem funkcją Abrahama) b) funkcja rezydualna dopasowania .....	73
Rysunek 40 Porównanie modeli opisujących sygnał $^1\text{H-NMR}$ pochodzący od fazy stałej pokryw <i>T. molitor</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.18$ : a) model dopasowany do zmierzonego widma (model uwzględnia funkcję Lorentza opisującą sygnał od protonów cieczowych) b) funkcja rezydualna dopasowania .....	73
Rysunek 41 Zależność sygnału od protonów mobilnych w widmie $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>D. comatus</i> wyrażony w jednostkach pola pod sygnałem pochodzącym od składowej stałej widma, $A^L_i/A^S$ , a przedstawiony w funkcji poziomu hydratacji próbki. Zielonymi kropkami oznaczono udział sygnału od składowej $L_1$ , $A^L_1/A^S$ , niebieskimi od składowej $L_2$ , $A^L_2/A^S$ , wreszcie czerwonymi sumaryczny sygnał cieczowy.....	76
Rysunek 42 Zależność sygnału od protonów mobilnych w widmie $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> wyrażony w jednostkach pola pod sygnałem pochodzącym od składowej stałej widma, $A^L_i/A^S$ , a przedstawiony w funkcji poziomu hydratacji próbki. Zielonymi kropkami oznaczono udział sygnału od składowej $L_1$ , $A^L_1/A^S$ , niebieskimi od składowej $L_2$ , $A^L_2/A^S$ , wreszcie czerwonymi sumaryczny sygnał cieczowy.....	77
Rysunek 43 Zależność sygnału od protonów mobilnych w widmie $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>T. molitor</i> wyrażony w jednostkach pola pod sygnałem pochodzącym od składowej stałej widma, $A^L_i/A^S$ , a przedstawiony w funkcji poziomu hydratacji próbki. Zielonymi kropkami oznaczono udział sygnału od składowej $L_1$ , $A^L_1/A^S$ , niebieskimi od składowej $L_2$ , $A^L_2/A^S$ , wreszcie czerwonymi sumaryczny sygnał cieczowy.....	78

Rysunek 44 Zależność hydratacyjna szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•,•) dla pokryw <i>D. comatus</i> . Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy $T_2^*$ wyznaczone z równań (126).....	79
Rysunek 45 Zależność hydratacyjna szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•,•) dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> . Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy $T_2^*$ wyznaczone z równań (126).....	80
Rysunek 46 Zależność hydratacyjna szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•,•) dla pokryw <i>T. molitor</i> . Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy $T_2^*$ wyznaczone z równań (126).....	80
Rysunek 47 Zależność temperaturowa widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>D. comatus</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.077$ : a) zarejestrowane widma b) stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego $A^L/A^S$ .....	82
Rysunek 48 Zależność temperaturowa widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>D. comatus</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.145$ : a) zarejestrowane widma b) stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego $A^L/A^S$ .....	82
Rysunek 49 Zależność temperaturowa szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•) dla pokryw <i>D. comatus</i> . Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy $T_2^*$ wyznaczone z równań (126) .....	82
Rysunek 50 Zależność temperaturowa widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.087$ : a) zarejestrowane widma b) stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego $A^L/A^S$ .....	83
Rysunek 51 Zależność temperaturowa widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.138$ : a) zarejestrowane widma b) Stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego $A^L/A^S$ .....	84
Rysunek 52 Zależność temperaturowa szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•) dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> . Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy $T_2^*$ wyznaczone z równań (126) .....	84
Rysunek 53 Zależność temperaturowa widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>T. molitor</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.106$ : a) zarejestrowane widma b) Stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego $A^L/A^S$ .....	85
Rysunek 54 Zależność temperaturowa widm $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>T. molitor</i> uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.18$ : a) zarejestrowane widma b) Stosunek sygnału pochodzącego od protonów cieczy do sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego $A^L/A^S$ .....	85
Rysunek 55 Zależność temperaturowa szerokości połówkowych linii Gaussa (▪) oraz Lorentza (•,•,•) dla pokryw <i>T. molitor</i> . Puste punkty odpowiadają skali po prawej stronie i oznaczają czasy $T_2^*$ wyznaczone z równań (126) .....	86
Rysunek 56 Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>D. comatus</i> uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0=0.108$ , wykonany w temperaturze pokojowej; a) rodzina	

widm w funkcji odstępu $\tau$ między impulsami $\pi$ oraz $\pi/2$ ; b) funkcja relaksacji podłużnej dla linii pochodzącej od ciała stałego i linii od ciekzowej składowej widma; linia przerywana - dopasowanie jednoeksponencjalne, linia ciągła - dopasowanie dwueksponencjalne.....	88
Rysunek 57 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji podłużnej dla pokryw <i>D. comatus</i> : a) czasy relaksacji spin-sieć dla składowej ciekzowej wyznaczone z dopasowania dwueksponencjalnego, b) udział składowej ciekzowej o czasie $T_{11L}$ (parametr $C$ z równania (128)).....	88
Rysunek 58 Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej $T_1$ dla pokryw <i>Donus comatus</i> ; kwadraty - składowa stała, kółka – składowa ciekzowa, linie ciągłe - dopasowania funkcji (93) lub (95) (patrz rozdz. 5.4.6) .....	89
Rysunek 59 Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0=0.087$ , wykonany w temperaturze pokojowej; (a) rodzina widm w funkcji odstępu $\tau$ między impulsami $\pi$ oraz $\pi/2$ ; (b) funkcja relaksacji podłużnej dla linii pochodzącej od ciała stałego i linii od ciekzowej składowej widma; linia przerywana - dopasowanie jednoeksponencjalne, linia ciągła - dopasowanie dwueksponencjalne.....	90
Rysunek 60 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-sieciowej $T_1$ dla składowej stałej ( $\blacksquare$ ) oraz ciekzowej ( $\bullet$ ) dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> .....	90
Rysunek 61 Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej $T_1$ dla pokryw <i>Liparus glabrirostris</i> ; kwadraty - składowa stała, kółka – składowa ciekzowa, linie ciągłe - dopasowania funkcji (93) lub (95) (patrz rozdz. 5.4.6) .....	91
Rysunek 62 Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej $^1\text{H-NMR}$ dla pokryw <i>T. molitor</i> uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0=0.055$ , wykonany w temperaturze pokojowej; (a) rodzina widm w funkcji odstępu $\tau$ między impulsami $\pi$ oraz $\pi/2$ ; (b) funkcja relaksacji podłużnej dla linii pochodzącej od ciała stałego i linii od ciekzowej składowej widma; linia przerywana - dopasowanie jednoeksponencjalne, linia ciągła - dopasowanie dwueksponencjalne.....	92
Rysunek 63 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji podłużnej składowej stałej ( $\blacksquare$ ) oraz ciekzowych ( $\bullet, \bullet$ ) dla pokryw <i>T. molitor</i> .....	92
Rysunek 64 Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej $T_1$ dla pokryw <i>Tenebrio molitor</i> ; kwadraty - składowa stała, kółka – składowa ciekzowa, linie ciągłe - dopasowania funkcji (93) lub (95) (patrz rozdz. 5.4.6) .....	93
Rysunek 65 Zanik magnetyzacji poprzecznej składowej ciekzowej dla pokryw <i>D. comatus</i> o $\Delta m/m_0 = 0.077$ . Linia ciągła - dopasowanie funkcji (129) .....	94
Rysunek 66 Zależność temperaturowa czasu relaksacji poprzecznej $T_2$ składowej ciekzowej dla pokryw <i>D. comatus</i> o $\Delta m/m_0 = 0.077$ . Linie przerywane – dopasowania funkcji (97).....	95
Rysunek 67 Zanik magnetyzacji poprzecznej składowej ciekzowej dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> o $\Delta m/m_0 = 0.119$ . Linia ciągła - dopasowanie funkcji (129) .....	95
Rysunek 68 Zależność temperaturowa czasu relaksacji poprzecznej $T_2$ składowej ciekzowej dla pokryw <i>L. glabrirostris</i> o $\Delta m/m_0 = 0.119$ . Linie przerywane – dopasowania funkcji (97).....	96

Rysunek 69 Zanik magnetyzacji poprzecznej składowych cieczowych dla pokryw <i>T. molitor</i> o $\Delta m/m_0 = 0.13$ . Linie ciągłe - dopasowanie funkcji (129).....	96
Rysunek 70 Zależność temperaturowa czasu relaksacji poprzecznej $T_2$ składowych cieczowych dla pokryw <i>T. molitor</i> o $\Delta m/m_0 = 0.13$ . Linie przerywane - dopasowanie funkcji (97).....	97
Rysunek 71 Przykładowa seria widm zarejestrowanych przy pomocy sekwencji selektywnego wzbudzenia dla pokryw <i>D. comatus</i> .....	98
Rysunek 72 a) Zmiana magnetyzacji podłużnej w czasie dla składowej stałej ( $\blacksquare$ ) i składowej cieczowej ( $\bullet$ ), b) zredukowana postać magnetyzacji (patrz równanie (98)) wraz z dopasowaniem funkcji (100).....	99
Rysunek 73 a) Zależność temperaturowa szybkości transferu magnetyzacji, b) stosunek liczby protonów cieczowych do liczby protonów ciała stałego podlegających procesowi transferu magnetyzacji dla pokryw <i>D. comatus</i> uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.077$ .....	99
Rysunek 74 Porównanie czasu relaksacji podłużnej wyznaczonego przy użyciu sekwencji <i>Inversion recovery</i> (patrz rozdział 7.6.1) oraz sekwencji <i>Soft-hard</i> . Linie ciągłe – dopasowania funkcji (93).....	100
Rysunek 75 Profile dyspersyjne uzyskane metodą relaksometrii FC-NMR. Po prawej obszar z maksimumi kwadrupolowymi wraz z dopasowaniem funkcji (131) .....	101



# 14 Spis tabel

Tabela 1 Substancje użyte do hydratacji z fazy gazowej.....	51
Tabela 2 Masy próbek użytych do pomiarów spektroskopii $^1\text{H-NMR}$ .....	51
Tabela 3 Parametry dopasowań równań izoterm sorpcyjnych (118)-(121).....	66
Tabela 4 Wartości parametrów AIC (Informacyjnego Kryterium Akaikego dla analizowanych modeli izoterm .....	66
Tabela 5 Parametry dopasowań linii odpowiadających protonom ciała stałego .....	75
Tabela 6 Odległości $r_{HH}$ oraz $r_{CH}$ odpowiadające dopasowanemu parametrowi rozszczepienia dubletu Pake'a.....	75
Tabela 7 Parametry dopasowania tła funkcji (131) do profilu NMRD (u góry) oraz położenia funkcji Lorentza wraz z odpowiadającymi im wartościami $a_{qcc}$ i $\eta$ (na dole).....	102
Tabela 8 Parametry krystalograficzne chityny i chitozanu (Se-Kwon 2010).....	108



# 15 Spis publikacji autorki

1. Harańczyk, H. i in., 2012. Bound water freezing in Antarctic *Umbilicaria aprina* from Schirmacher Oasis. *Antarctic Science*, 24(04), ss.342–352.
2. Harańczyk, H. i in., 2012. Water Bound in Elytra of the Weevil *Liparus glabrirostris* (Küster, 1849) by NMR and Sorption Isotherm (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Physica Polonica A*, 121(2), ss.491–496.
3. Hetmańczyk, J. i in., 2014. Vibrations and reorientations of H<sub>2</sub>O molecules in [Sr(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]Cl<sub>2</sub> studied by Raman light scattering, incoherent inelastic neutron scattering and proton magnetic resonance. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 124, ss.429–40.
4. Piecha-Bisiorek, A. i in., 2014. Dynamics of Ferroelectric Bis (imidazolium) Pentachloroantimonate (III) by Means of Nuclear Magnetic Resonance <sup>1</sup>H Relaxometry and Dielectric Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118, ss.3564–3571.
5. Masierak, W. i in., 2015. Dynamics of [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>]<sub>6</sub>[Bi<sub>4</sub>Br<sub>18</sub>] by means of <sup>1</sup>H NMR relaxometry and quadrupole relaxation enhancement. *The Journal of Chemical Physics*, 142(20), s.204503.
6. Harańczyk, H. i in., 2015. Non-cooperative Immobilization of Residual Water Bound in Lyophilized Photosynthetic Lamellae. *Cellular & molecular biology letters*, 20(5), ss. 717-35.
7. Florek-Wojciechowska, M. i in. 2016., <sup>1</sup>H NMR relaxometry as a sensitive probe of dynamical properties of solids - Gu<sub>3</sub>Bi<sub>2</sub>I<sub>9</sub> as an example. *The Journal of Chemical Physics*, 144, s. 054501
8. Harańczyk, H. i in., 2016. A method of water-soluble solid fraction saturation concentration evaluation in dry thalli of Antarctic lichenized fungi, in vivo. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 6, ss.226–235.
9. Kruk, D. i in., 2016. Dynamics of Molecular Crystals by Means of <sup>1</sup>H NMR Relaxometry: Dynamical Heterogeneity versus Homogenous Motion. *ChemPhysChem*.  
Doi: 10.1002/cphc.201600151